URSACHEN DER BIOLOGISCHEN PERSISTENZ CHLORIERTER AROMATISCHER KOHLENWASSERSTOFFE: EINFLUSS VON HALOGENSUBSTITUENTEN AUF DIE INTRADIOL-SPALTUNG VON BRENZCATECHIN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Erich Dorn
aus Hofen

Göttingen 1976

URSACHEN DER BIOLOGISCHEN PERSISTENZ CHLORIERTER AROMATISCHER KOHLENWASSERSTOFFE: EINFLUSS VON HALOGENSUBSTITUENTEN AUF DIE INTRADIOL-SPALTUNG VON BRENZCATECHIN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Erich Dorn
aus Hofen

Göttingen 1976

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

Die Untersuchungen sind aus dem Forschungsprojekt 73740 der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München hervorgegangen und wurden durch ein Doktorandenstipendium gefördert.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H.-J. Knackmuss
Korreferent: Prof. Dr. H.G. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 2. 1976

Meinen Eltern gewidmet

ABKÜRZUNGEN

A	Absorption
ATCC	American Type Culture Collection
BC	Brenzcatechin
Bis	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
p-CMB	p-Chlormercuribenzoat
2.4.-D	2,4-Dichlorphenoxyacetat
DDE	2,2-Bis-(p-Chlorphenyl)-1,1-dichloräthen
DDT	2,2-Bis-(p-Chlorphenyl)-1,1,1-trichloräthan
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DH	Dehydrogenase
DHB	3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
E	Enzymeinheit
E_a	Arrhenius-Aktivierungsenergie
EDTA	Äthylen-diamin-tetraessigsäure
G	Freie Enthalpie
H	Enthalpie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MG	Molekulargewicht
NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (oxidiert)
Per	Ammoniumperoxydisulfat
S	Entropie
σ	HAMMETT'sche Substituentenkonstante
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
$\neq$	Der Index $\neq$ wird im Zusammenhang mit dem Übergangszustand einer Reaktion verwendet. Als Index von thermodynamischen Zustandsfunktionen (z.B. H, G, S) wird der Vorgang der Aktivierung gekennzeichnet.

Definition: Zur Benennung der beiden Pyrocatechasen aus Pseudomonas Stamm B.13 siehe S. 33. Das Adjektiv gewöhnlich, im Zusammenhang mit Enzymen und Bakterien verwendet, bezeichnet stets den Abbau von unsubstituierten aromatischen Verbindungen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534920_0009

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. METHODEN 3

III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE 21

1. Nachweis von zwei unterscheidbaren Pyrocatechase-aktivitäten in Pseudomonas Stamm B.13 21

1.1. Wachstum von Pseudomonas Stamm B.13 auf Benzoat und m-Chlorbenzoat 22
1.2. Induzierbarkeit der Chlorpyrocatechase 25
1.3. DEAE-Zellulosechromatographie der Rohextrakte aus Zellen nach Anzucht auf Benzoat bzw. m-Chlorbenzoat 27
1.4. Umsetzung von α- und β-Chlormuconsäure mit Rohextrakt aus Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat 30
1.5. Zusammenfassung 33

2. Anreicherung und Charakterisierung der zwei Pyrocatechasen aus Pseudomonas Stamm B.13 34

2.1. Anreicherung der Pyrocatechasen aus Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat 34
2.1.1. Fraktionierung des Rohextraktes aus Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat an DEAE-Zellulose 35
2.1.2. Versuche zur Anreicherung der Chlorpyrocatechase 37
2.1.3. Anreicherung der normalen Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13 41
2.1.3.1. Wiederholte DEAE-Zellulosechromatographie mit der normalen Pyrocatechase 41

Seite

2.1.3.2. Chromatographie an DEAE-Sephadex 42
2.1.3.3. Sephadex G 200-Gelfiltration 43
2.2. Charakterisierung der beiden Pyrocatechasen aus Pseudeomonas Stamm B.13 45
2.2.1. Reinheitskontrolle und Bestimmung der R_f-Werte bei der Gelelektrophorese 45
2.2.2. Stabilität der beiden Pyrocatechasen aus Pseudomonas Stamm B.13 bei verschiedenen Lagerbedingungen 48
2.2.3. pH-Optima 49
2.2.4. Einfluß von Schwermetallionen und SH-Reagenzien auf die Aktivität der beiden Pyrocatechasen aus Pseudomonas Stamm B.13 53
2.2.5. Molekulargewichtsbestimmungen der Pyrocatechasen 55
2.2.5.1. Analytische Ultrazentrifugation 55
2.2.5.2. Sephadex G 200-Gelfiltration 59
2.2.5.3. Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation 61
2.2.5.4. Porengrößengradienten-Gelelektrophorese 64
2.2.5.5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen 66
2.2.6. Meta-Spaltung von 3-Methylbrenzcatechin durch die normale ortho-Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13 68
2.2.7. Absorptionsspektrum der normalen Pyrocatechase 72

3. Enzymkinetische Analyse der Substituenteneinflüsse auf die ortho-Spaltung von Brenzcatechin 73

3.1. Reinigung der Pyrocatechase aus Alcaligenes eutrophus B.9 73
3.2. Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten substituierter Muconsäuren 74
3.3. Enzymatische Darstellung von 3- und 4-Fluor- sowie 3-Brombrenzcatechin in Lösung 75

Seite

3.4. V_{max}- und K_m- bzw. K_i-Werte von drei Pyrocatechasen für substituierte Brenzcatechine 77

3.4.1. Aktivität der Chlorpyrocatechase mit mehrfach chlorierten Brenzcatechinen 78

3.4.2. Zusammenstellung der kinetischen Daten 80

3.4.3. Art der Hemmung 83

3.4.4. Vergleich der enzymkinetischen Daten für die normale Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13 und die Pyrocatechase aus Alcaligenes eutrophus 84

3.4.5. Substituenteneinflüsse auf die Substratbindung 84

3.5. Temperaturoptima und Aktivierungsenergien 90

IV. DISKUSSION 96

V. ZUSAMMENFASSUNG 121

VI. LITERATURVERZEICHNIS 124

I. EINLEITUNG

Eine organische Verbindung gilt als persistent, wenn diese unter allen biotischen Bedingungen so langsam abgebaut wird, daß eine globale Akkumulation die Folge ist. Neben der reversiblen Hemmung wichtiger Stoffwechselfunktionen durch die angehäuften Stoffe stellen die irreversiblen mutagenen und karzinogenen Effekte ein besonderes Risiko dar (HENSCHLER, 1973).

Chloraromatische Verbindungen wie z.B. Pentachlorphenol, DDT oder polychlorierte Biphenyle gehören zu den spektakulärsten umweltbelastenden Substanzen (ALEXANDER, 1975; ALEXANDER, 1973) Da auch sehr komplizierte aromatische Verbindungen wie Polycyclen und aromatische Steroide rasch abgebaut werden (GIBSON, 1968; RIBBONS, 1965), stellte sich die Frage, ob das Strukturelement Chlor-Aromat Persistenz verursacht. Zur Untersuchung dieser Problematik mußte eine Modellreaktion ausgewählt werden, welche als Reaktionstyp allen Aromatenabbauwegen zugrunde liegt

Der unsubstituierte Aromat ist wegen der hohen Resonanzenergie reaktionsträge (BEYER, 1966, S. 388 ff). Aromatenabbauende Organismen aktivieren den Kern in Reaktionen mit molekularem Sauerstoff durch Hydroxylierung. Dies erhöht die Nukleophilie und damit die Reaktionsbereitschaft mit elektrophilen Agenzien. Für die nachfolgende oxidative Ringspaltung sind trotz der Vielfalt der von aeroben Mikroorganismen abbaubaren substituierten Arene im wesentlichen nur drei Prinzipien bekannt: ortho- und meta-Spaltung von 1.2-Diphenolen und 1.2-Spaltung von 1.4-Diphenolen unter formaler Einschiebung eines Sauerstoffmoleküls. Nach dem von GIBSON (1968) formulierten Reaktionsmechanismus für die meta-Spaltung von Brenzcatechin und den Untersuchungen von FUJISAWA (1972b) zur ortho-Spaltung von Protocatechusäure ist eine elektrophile Addition des Sauerstoffs an den aromatischen Kern wahrscheinlich. Nach dieser Annahme sollten elektronenabziehende Substituenten wie Chlor die Ringspaltung erschweren.

Brenzcatechin nimmt eine Schlüsselstellung im Abbau vieler aromatischer Verbindungen ein (GIBSON, 1968). Beim Kometabolismus halogensubstituierter Aromaten wurde vielfach die Akkumulation der entsprechenden Brenzcatechine beobachtet (HORVATH, 1972; HORVATH und ALEXANDER, 1970; FEWSON et al., 1968; TRANTER und CAIN, 1967; HORVATH, 1971). Da außerdem die Enzyme des β-Ketoadipinsäure-Weges, ausgehend von Brenzcatechin, gut untersucht waren (ORNSTON, 1966b; KOJIMA et al., 1967), wurde die oxygenolytische Ringöffnung (ortho-Spaltung) von Brenzcatechin als Modellreaktion ausgewählt.

Substratbindung und Umsatzgeschwindigkeiten unterschiedlich substituierter Brenzcatechine sollten an Pyrocatechasen aus verschiedenen Organismen untersucht werden. Durch Vergleich der kinetischen Daten sollten die Gesetzmäßigkeiten der Substituenteneinflüsse auf die Pyrocatechasereaktion ermittelt werden.

II. METHODEN

1. Organismen

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im wesentlichen mit dem von DORN et al. (1974) isolierten Pseudomonas Stamm B.13 (DSM 426) durchgeführt. Außerdem wurden Alcaligenes eutrophus Stamm 335 (ATCC 17697) und die davon abgeleitete Mutante A. eutrophus B.9 (JOHNSON und STANIER, 1971b) verwendet.

2. Nährlösung und Anzucht

2.1. Nährlösung

Für die Anzucht von Ps. Stamm B.13 wurde die von DORN et al. (1974) angegebene Mineralnährlösung verwendet. Wenn nicht anders erwähnt, betrug die Konzentration der Kohlenstoffquelle 10 mM. Zur Anzucht von A. eutrophus (Wildstamm) und Mutante B.9 wurde die von JOHNSON und STANIER (1971a) angegebene Nährlösung verwendet mit dem Unterschied, daß die Spurenelementlösung SL 6 entsprechend SL 4 (nach PFENNIG und LIPPERT, 1966) ohne EDTA und $FeSO_4$ eingesetzt wurde.

2.2. Anzucht der Zellen

Zur Anzucht der drei Bakterienstämme wurden von gut bewachsenen, frischen Agarplatten mit der Impföse 30 ml Nährlösung in 300 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen beimpft, und auf einem Rotationsschüttler (170 U/min) bei 30 °C inkubiert. Mit dieser Kultur wurden 200 ml Nährlösung in 2 l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen beimpft und wie oben inkubiert. Diese Bakteriensuspension diente als Impfgut für die Anzucht in einem 10 l-Fermenter (Biostat, Fa. Braun, Melsungen) bei 600 U/min, einer Luftzufuhr von 8 l/min und 30 °C. Die Bakterien wurden mit Ausnahme von A. eutrophus B.9 am Ende der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Christ Zentrifuge (Modell IV KS, Fa. Heraeus-Christ, Osterode/Harz) bei 25 °C geerntet. A. eutrophus B.9 wurde nach Beendigung des Wachstums 4 Stunden lang mit 2 mM Benzoat induziert

und ebenfalls abzentrifugiert. Wie aus dem Hochdruckflüssigkeitschromatogramm hervorging, enthielt die Kulturflüssigkeit noch geringe Mengen an Benzoat und viel 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure (DHB) [1]. Die Zellen der drei Bakterienstämme wurden jeweils einmal mit dem Phosphatpuffer der Nährlösung gewaschen und, wenn nicht anders angegeben, in Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0, 1 mM Mercaptoäthanol) resuspendiert. Die Zellen wurden sofort aufgeschlossen.

Anzucht großer Zellmengen

Zur Gewinnung großer Zellmengen für die Anreicherung der Pyrocatechasen wurde Ps. Stamm B.13 mit meta-Chlorbenzoat als Substrat bis zu einer Zelltrübung von A_{546nm} = 14 im 10 l-Fermenter angezogen. Da der pH-Wert des Mediums nach Aufbrauch von 15 - 20 mM m-Chlorbenzoat schnell unter 6,5 absank, wurden simultan zu Kohlenstoffquelle und Mineralsalzen äquimolare Mengen NaOH zugespeist. Mit Hilfe einer Sechskanal-Schlauchpumpe (Fa. Desaga, Heidelberg) wurden der Kulturflüssigkeit während des Wachstums gleiche Volumina an 1 M m-Chlorbenzoat-Lösung, 1 M NaOH und 100-fach konzentrierter Mineralsalz-Lösung kontinuierlich zugeführt. Die Fördergeschwindigkeit der Pumpe wurde so reguliert, daß die m-Chlorbenzoat-Konzentration im Medium zwischen 5 und 10 mM lag. Die Substratkonzentration wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (s. Methoden 10.) ständig überprüft. Die oberhalb der Trübung von A_{546} = 6,5 eintretende starke Schaumentwicklung wurde durch Zuspeisen von Octanol (ca. 0,02 ml/min) mit Hilfe einer separaten Einkanal-Schlauchpumpe (Modell 12000 Varioperpex, Fa. LKB, Schweden) unterdrückt. Das Wachstum verlief unter den Bedingungen streng exponentiell. Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet.

3. Trübungsmessung

Die optische Dichte der Zellsuspensionen wurde durch Extinktionsmessung bei 546 nm und einer Schichtdicke von d = 1 cm im

---

[1]) DHB = hergeleitet vom Trivialnamen "Dihydrodihydroxybenzoat"

Zeiss-Spektralphotometer DMR 10 bestimmt. Überstieg die Extinktion den Wert von 0,3, so wurden die Proben entsprechend verdünnt.

4. Herstellung zellfreier Extrakte

Die Dichte der Zellsuspensionen betrug 1 g feuchte Zellmasse in 3 ml Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0, 1 mM Mercaptoäthanol). Nach Zugabe von DNase wurden die Zellen einmal mit einer vorgekühlten Frenchpresse (Aminco, USA) bei einem Druck von 80 kp/cm^2 aufgeschlossen. Noch intakt gebliebene Zellen und grobe Zellbruchstücke wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 30000 x g entfernt. Das Überstehende wurde 90 min bei 180000 x g in einer Omikron Zentrifuge (Fa. Christ, Osterode, Harz) zentrifugiert. Der Überstand (≙Rohextrakt) wurde abgehebert und das Sediment verworfen.

5. Proteinbestimmung

Bei Enzymanreicherungen wurde zur Proteinbestimmung sehr verdünnter Lösungen die Methode von WARBURG und CHRISTIAN (1941) verwendet. Zur Kontrolle und vor allem für die Messung der Proteinkonzentrationen in Rohextrakten wurde die Methode von BEISENHERZ et al. (1953) angewandt.

6. Manometrische Bestimmung der Sauerstoffaufnahme

Gaswechselmessungen wurden in einem Rundwarburg (Typ 166, Fa. Braun, Melsungen) mit Luft als Gasphase bei einer Schüttelfrequenz von 110/min und einer Amplitude von 7 cm durchgeführt. Die Versuchstemperatur betrug 30 ^{o}C. Die Gefäße wurden bis zum Temperaturausgleich geschüttelt. Durch Kippen der Substratlösung in den Hauptraum wurden die Reaktionen gestartet. Im Abstand von 10 min wurde abgelesen.

a. Manometrische Messung mit ganzen Zellen von Ps. Stamm B.13 nach Anzucht auf Benzoat

Die Zellen wurden nach der Ernte zweimal mit Mineralnährlösung ohne Kohlenstoff- und Stickstoffquelle gewaschen und auch darin resuspendiert. Die Warburggefäße enthielten

im Hauptraum: 2 ml Zellsuspension mit einer Trübung von A_{546} = 0,5
im Seitenarm: 3 µmole Substrat in 0,2 ml
im Zentalzylinder : 0,2 ml 20%-ige NaOH

b. Manometrische Bestimmung der Oxygenierung von Brenzcatechinen

Als Substrate wurden die enzymatisch synthetisierten Fluor- und Brombrenzcatechine eingesetzt (s. Methoden 17.). Die Warburggefäße enthielten

im Hauptraum: 3 µmole Substrat in 2.2 ml Tris-HCl-Puffer (33,3 mM, pH 8,0, 3,3 mM Mercaptoäthanol)
im Seitenarm: 0,2 ml Chlorpyrocatechase-Lösung (≙ 215 µg Protein)

7. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Aktivität von einer Enzymeinheit (E) ist definiert als der Umsatz von 1 µmol Substrat/min unter den angegebenen Testbedingungen. Unter den beschriebenen Bedingungen verliefen die Reaktionsgeschwindigkeiten linear und waren den eingesetzten Enzymkonzentrationen proportional. Alle Enzymaktivitäten wurden bei Raumtemperatur im Zeiss Spektralphotometer DMR 10 in 1 cm-Küvetten bestimmt.

7.1. Pyrocatechase

Verändert nach ORNSTON und STANIER (1966) enthielten die Reaktionsansätze in 3 ml:

Tris-HCl, pH 8,0	100 µmole
Mercaptoäthanol	10 µmole
Brenzcatechin und substituierte Brenzcatechine	0,5 - 1 µmole
Enzymlösung	0,02 - 0,1 ml

Die photometrischen Aktivitätsbestimmungen mit allen substituierten Brenzcatechinen mit Ausnahme von Protocatechuat wurden durch Ermittlung der Extinktionsänderung ΔE/min bei 260 nm durchgeführt. Die Umsatzraten mit Protocatechuat wurden nach der Methode von STANIER und INGRAHAM (1954) gemessen. ΔE_{260} wurde mit Hilfe der in Tab. 9 zusammengestellten molaren Extinktionskoeffizienten für substituierte Muconsäuren auf die gebildete Menge Produkt in µmolen umgerechnet. Bei Aktivitätsmessungen in Rohextrakten wurden zur Hemmung der nachfolgenden Lactonasereaktionen 4 µmole EDTA dem Testansatz zugegeben. In den Rohextrakten von Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat waren normale Pyrocatechase und Chlorpyrocatechase gleichzeitig vorhanden. Zur getrennten Bestimmung der beiden Aktivitäten wurde folgendermaßen verfahren:

Die Umsatzgeschwindigkeiten wurden mit 3-Chlorbrenzcatechin sowie mit Brenzcatechin als Substraten bestimmt. Die Aktivität mit dem chlorierten Substrat wurde als reine Chlorpyrocatechaseaktivität angenommen und nach Tab. 10a auf die Umsatzrate mit Brenzcatechin umgerechnet; denn die relative Aktivität mit 3-Chlorbrenzcatechin betrug 105% und mit Brenzcatechin nur 100%. Der somit vernachlässigte 3-Chlorbrenzcatechinumsatz durch die normale Pyrocatechase - relative Aktivität mit 3-Chlorbrenzcatechin = 0,7% bezogen auf den Umsatz von Brenzcatechin (s. Tab. 10a) - liegt in der Größenordnung der normalen Fehlerschwankung. Die Chlorpyrocatechaseaktivität mit Brenzcatechin wurde von der Gesamtaktivität mit Brenzcatechin abgezogen und der Aktivität der normalen Pyrocatechase gleichgesetzt.

$$\text{Chlorpyrocatechaseaktivität} = (\text{Aktivität mit 3-Cl-BC}) \cdot \frac{100\%}{105\%}$$

Aktivität der normalen Pyrocatechase = (Gesamtaktivität mit BC)

— (Chlorpyrocatechaseaktivität)

Die Reaktionsansätze für die Umsetzungen der höherchlorierten Brenzcatechine enthielten in 1 ml folgende Komponenten:

Tris-HCl pH 8,0	33,3 µmole
Mercaptoäthanol	3,3 µmole
DMSO	16 µmole
Substituiertes BC	0,33 µmole
Chlorpyrocatechase	20 - 430 mE (bezogen auf Brenzcatechinumsatz)

7.2. Muconat-Lactonase

Zur Bestimmung der Lactonaseaktivität mit unsubstituierter cis,cis-Muconsäure wurde die Methode von ORNSTON (1966b) verwendet. Chlorierte Muconsäuren wurden, wie in Kap. 15 (Methoden) beschrieben, enzymatisch synthetisiert. Obwohl angenommen werden muß, daß die primär gebildeten Produkte der Lactonisierung ebenfalls einen Dienchromophor besitzen (vgl. Abb. 25), der bei der Testwellenlänge λ = 260 nm noch absorbiert, nahm die Absorption bei 260 nm rasch ab. Die getesteten Rohextrakte ließen aus α- und β-Chlormuconsäure in Gegenwart von Mercaptoäthanol kein Auftreten von Primärprodukten der Lactonisierung erkennen. Da am Ende der Reaktion wie bei der normalen Lactonasereaktion keine Absorption bei λ = 260 nm mehr vorhanden war, wurde der gleiche Testansatz wie auch für die unsubstituierte Muconsäure verwendet. Die Aktivitäten wurden auf Grund der Extinktionsabnahme bei 260 nm bestimmt und mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten (s. Tab. 9) berechnet. Die Bestimmung ist dann fehlerhaft, wenn die nachfolgenden Umwandlungsreaktionen bis zu Produkten ohne Absorption bei 260 nm langsamer ablaufen als die Lactonisierung. Die realen Lactonaseaktivitäten mit chlorierten Muconsäuren sind daher gleich oder größer als die

angegebenen Werte.

7.3. DHB-Dehydrogenase

Die Aktivität der DHB-Dehydrogenase wurde an Hand der DHB-abhängigen NADH-Bildung nach REINER (1972) bestimmt.

7.4. Referenzproteine für Molekulargewichtsbestimmungen

Für die Aktivitätsbestimmungen der Referenzproteine wurden folgende aus der Literatur bekannte Methoden verwendet:

1. Katalase E.C.1.11.1.6. nach Boehringer Information 1962 (BERGMEYER, 1955)
2. Fructose-1,6-diphosphat-aldolase E.C.4.1.2.7. nach Boehringer Information 1964 (RACKER, 1947)

Die Verteilung aller anderen Referenzproteine wurde durch Messung der Absorption (Ferritin: A_{400}, Chymotrypsinogen A: A_{280} und Cytochrom c: A_{415}) bestimmt.

8. Spektroskopie

Die Spektren wurden mit einem Zeiss Spektralphotometer DMR 10 in 1 cm-Küvetten gemessen.

9. Chloridbestimmung

Chloridionen wurden nach der Methode von BERGMANN und SANIK (1957) bestimmt.

10. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bekannte Prinzipien wie Verteilungs-, Adsorptions- oder Ionenaustauschchromatographie sind auch die Grundlage der HPLC. Der Nachteil früherer Methoden der Niederdruckflüssigkeitschromatographie (Säulenchromatographie) war die geringe Trennleistung

("Schwanzbildung") auf Grund hoher und nicht einheitlicher Partikel- und Porengrößen der Packungsmaterialien. Andererseits wurde mit der Entwicklung von Trägermaterialien und Sorptionsmitteln mit gleichmäßigen, sehr kleinen Korn- und Porengrößen der Gegendruck und damit die Retentionszeit stark erhöht. Die Anwendung hoher Drucke, bei gleichmäßiger Flußrate, erfordert einen hohen technischen Aufwand und kann diesen Nachteil kompensieren. An Hand von Abb. 1 soll die Funktionsweise eines Hochdruckflüssigkeitschromatographen erklärt werden.

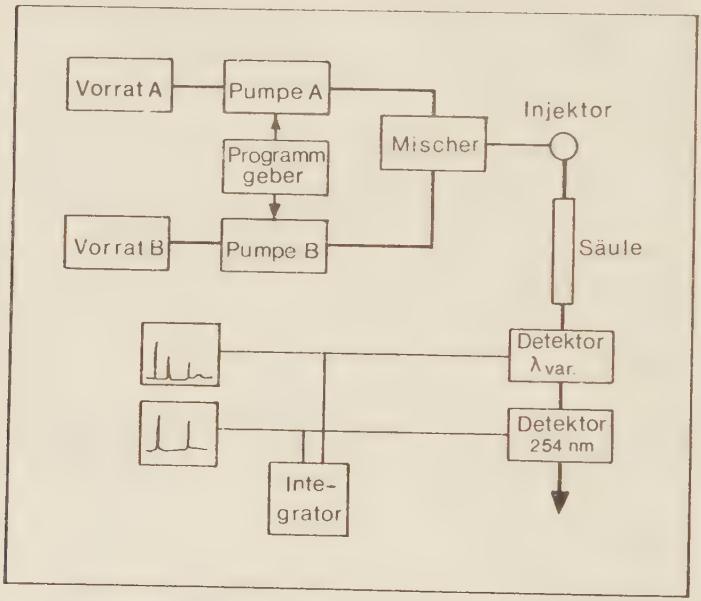


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Hochdruckflüssigkeitschromatographen

In die Vorratsgefäße wurden die unter Wasserstrahlvakuum entgasten Fließmittel eingefüllt. Die Füllung der Pumpen erfolgt unter 3 atü Druck. Anschließend wurde das Leitungssystem bis zum Injektor mit dem jeweiligen Fließmittel gespült. Nachdem

die Pumpen die gewählte Flußrate erzeugt hatten und dabei einen bestimmten Gegendruck (normalerweise 100 - 200 atü) aufgebaut hatten und die vom Schreiber aufgezeichnete Basislinie konstant blieb, wurde der Fluß oberhalb des Injektors unterbrochen und die Probe durch den Injektor drucklos mit Hilfe einer µl-Spritze (Fa. Hamilton,Schweiz) auf die Säule aufgetragen. Mit Verschluß des Injektors wurden die Pumpen gleichzeitig wieder eingeschaltet, der Fluß zur Säule freigegeben und Schreiber und Integrator in Betrieb gesetzt. Für alle Untersuchungen wurde eine "reverse phase"-Säule (unpolare stationäre Phase) verwendet. Das Säuleneluat durchlief die Mikrodurchflußzellen (8 µl) eines Detektors mit konstanter Wellenlänge (254 nm) und eines fünffach unempfindlicheren Spektralphotometers mit frei wählbarer Wellenlänge zwischen 200 und 800 nm. Die Absorptionsverläufe wurden von einem Zweikanalschreiber registriert und die Peakflächen vom Integrator errechnet und ausgedruckt. Die Temperatur der Durchflußzellen wurde mit Hilfe eines Thermostaten (Fa. Meßgerätewerk Lauda) konstant gehalten. Um Temperaturschwankungen zu verhindern, wurde die Säule mit Isoliermaterial umwickelt. Alle Analysen wurden bei konstanter Fließmittelzusammensetzung durchgeführt.

Im einzelnen wurden folgende Geräte verwendet und Bedingungen eingehalten:

Fließmittel:	10 mM H_3PO_4 mit verschiedenen Konzentrationen an Propanol
Pumpe:	Zwangsfördernde Langhubkolbenpumpe (Fa. Varian Aerograph, Palo Alto, USA)
Flußrate:	50 ml/Stunde
Druck:	100 - 200 atü
Hochdruckflüssigkeitschromatograph:	Modell 4200 (Fa. Varian Aerograph)
Injektor:	"Stop-flow"-Injektor
Säule:	MicroPak C-H-Säule (Packungsmaterial: Octadecylsilan an LiChrosorb gebunden, Partikelgröße 10 micron), Länge: 25 cm, i.D.: 2 mm
UV-Detektor 1:	λ = 254 nm

Detektor 2: Spektralphotometer Variscan^{TM}, Modell 635 (Fa. Varian Techtron, Springvale, Australien)

Integrator: Autolab System I (Fa. Spectra Physics, Santa Clara, USA)

Schreiber: Zweikanalschreiber, Modell A-25 (Fa. Varian Aerograph, Walnut Creek, USA)

Die mit Hilfe der HPLC analysierten noch Protein enthaltenden Proben (2 - 5 µl) wurden ohne Vorbehandlung auf die Säule aufgetragen. Zur Produktanalyse beim Umsatz von mehrfachchlorierten Brenzcatechinen mit Chlorpyrocatechase wurde 10 mM H_3PO_4 mit 15% Propanol als Fließmittel verwendet. Bei allen übrigen Analysen enthielt die 10 mM Phosphorsäure 1% Propanol.

11. Anreicherung von Enzymen

Die weiteren Anreicherungsversuche mit der Chlorpyrocatechase nach Abtrennung von der normalen Pyrocatechase in der ersten DEAE-Zellulose-Chromatographie wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle anderen Enzyme wurden bei 0 - 4 °C angereichert. Ausgangsmaterial für die erste Chromatographie an DEAE-Zellulose war stets unbehandelter Rohextrakt (Kap. 4, Methoden).

Für die Chromatographie der Chlorpyrocatechase an DEAE-Zellulose und DEAE-Sephadex bei Raumtemperatur wurde ein Fraktionssammler mit Durchflußphotometer (Modell Uvicord II, Fa. LKB, Bromma, Schweden) und Fallbügelschreiber (Fa. Colora Meßtechnik, Lorch) verwendet. Für alle übrigen Säulenchromatographieschritte bei 4 °C wurde ein Fraktionssammler (RadiRac, Fa. LKB, Bromma, Schweden) mit Durchflußphotometer (Uvicord Typ 4701 A, Fa. LKB) und Fallbügelschreiber (Fa. Colora Meßtechnik, Lorch) eingesetzt.

11.1. Konzentrierung von Proteinlösungen

Die vereinigten, aktivsten Fraktionen eines Säuleneluates wur-

den zur Ammoniumsulfatfällung eingesetzt. Gepulvertes Ammoniumsulfat wurde den verdünnten Proteinlösungen bis zur 85%-igen Sättigung unter Rühren langsam zugegeben. Schaumbildung wurde vermieden. Nach weiteren 20 min Rühren wurde der Niederschlag 20 min bei 20000 x g in einer Christ Zentrifuge (Zeta 20, Fa. Heraeus-Christ, Osterode, Harz) zentrifugiert. Das Pellet wurde in wenig Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8.0, 1 mM Mercaptoäthanol) gelöst und in einen vorgequollenen Dialyseschlauch gefüllt. Die Proteinlösungen wurden über Nacht gegen zweimal 2 l Tris-HCl-Puffer dialysiert. Für die Chlorpyrocatechase wurden alle Schritte bei Raumtemperatur, für alle anderen Enzyme bei 0 bis 4 °C durchgeführt.

11.2. DEAE-Zellulosechromatographie

Der Anionenaustauscher DE 52 (Whatman Biochemicals Ltd.,Maidstone, Kent, England) wurde gegen Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0, 1 mM Mercaptoäthanol) äquilibriert. Die Säule vom Typ K 26/40 - Höhe 40 cm, Ø 2,6 cm - war 30 cm hoch und diejenige vom Typ K 50 - Höhe 60 cm, Ø 5 cm - (beide Säulen von Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) 40 cm hoch mit DEAE-Zellulose gefüllt.

Die konzentrierten Proteinlösungen wurden auf die Säulen aufgetragen und nach Eindringen in das Säulenbett mit 30 bzw. 70 ml Puffer gewaschen. Die Elution wurde mit linearen Salzgradienten von 0 - 0,5 M NaCl im Äquilibrierungspuffer (2 x 500 ml bei der Säule vom Typ K 26/40 und 2 x 1 l bei der Säule vom Typ K 50) durchgeführt. Für Fraktionsvolumen, Durchflußrate und Arbeitsdruck siehe Legenden zu den jeweiligen Elutionsdiagrammen.

11.3. DEAE-Sephadex A 50-Chromatographie

DEAE-Sephadex A 50 (Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) wurde 20 Stunden bei 80 °C in Tris-HCl-Puffer (20 mM,

pH 8,0, 1 mM Mercaptoäthanol) gequollen. Eine Säule vom Typ K 26/40 (s. Methoden 11.2.) wurde 32 cm hoch gefüllt und gegen den Elutionspuffer ausreichend (dreifaches Bettvolumen) äquilibriert. Die konzentrierten Proteinlösungen wurden mit Hilfe eines Flow-Adapters auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 0 - 0,5 M NaCl (2 x 500 ml) in Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0, 1 mM Mercaptoäthanol).

11.4. Sephadex G 200-Gelfiltration

Sephadex G 200 fine (Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) wurde 30 Stunden bei 80 °C in Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0, 1 mM Mercaptoäthanol) gequollen. Eine Säule von derselben Firma - Höhe 100 cm, Ø 2,5 cm - wurde 86 cm hoch gefüllt und ausreichend mit dem Elutionspuffer äquilibriert. Das eingeengte Eluat der DEAE-Sephadex-Säule wurde mit Hilfe eines Flow-Adapters aufgetragen und mit Tris-HCl-Puffer eluiert.

12. Molekulargewichtsbestimmungen

12.1. Analytische Ultrazentrifugation

Die Experimente zur Bestimmung des Molekulargewichts und des Sedimentationskoeffizienten wurden mit einer analytischen Ultrazentrifuge (Fa. Beckman-Spinco, Modell E) durchgeführt. Protein- und Referenzlösung waren in Doppelsektorzellen mit Saphirfenstern und 12 mm Lichtweg eingefüllt. Die Enzymlösung war vor Versuchsbeginn noch einmal über Nacht gegen Tris-HCl-Puffer 20 mM, pH 8,0, 1 mM Mercaptoäthanol) dialysiert worden. Der dabei verwendete Dialysepuffer wurde als Referenz eingesetzt. Die Gleichgewichts-Sedimentation wurde mit Hilfe eines photoelektrischen Scanners bei λ = 280 nm registriert. Die Molekulargewichtsbestimmung wurde für verschiedene Proteinkonzentrationen bei 9000 U/min und 5 °C durchgeführt. Die Svedberg-Konstante $S_{c\ app.}$ wurde durch Zentrifugation bei 48000 U/min und 5 °C

bestimmt.

12.2. Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation

Die Bestimmung der relativen Sedimentationsgeschwindigkeiten wurde nach der von MARTIN und AMES (1961) sowie OEDING (1972) beschriebenen Methode durchgeführt. Mit Hilfe eines Gradientenformers (Modell 570, Fa. Desaga, Lincoln, USA) wurden Zellulose-Nitrat-Röhrchen mit Dichtegradienten von 7 - 30% Saccharose (w/w) in Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0, 1 mM Mercaptoäthanol) gefüllt. Das Volumen betrug 13,5 ml. Die Gradienten wurden mit 0,2 ml Probe überschichtet. 0,2 ml Chlorpyrocatechaselösung (= 460 µg Protein) wurden je 0,7 mg Katalase und Aldolase (Boehringer Combithek) als Referenzproteine zugesetzt. Das Enzymgemisch der normalen Pyrocatechase enthielt 50 µl der am stärksten gereinigten Fraktion. Die Gradienten wurden 17 Stunden lang in einer Christ-Ultrazentrifuge (Modell Omega II, 70000, 6 x 12 ml Schwenkbecher-Rotor, Fa. Heraeus-Christ, Osterode, Harz) bei einer mittleren Drehzahl von 37 000 U/min und 5 ^{o}C sowie 15 ^{o}C zentrifugiert. Die Gradienten wurden durch Anstechen der Zentrifugenbecher mit Hilfe einer Hohlnadel zu 6 Tropfen/Fraktion entnommen. In den Fraktionen wurden die Enzymaktivitäten gemessen.

12.3. G 200-Gelfiltration

Das Molekulargewicht der normalen Pyrocatechase wurde nach der von ANDREWS (1962) beschriebenen Methode bestimmt. Die Gelfiltration wurde, wie in Kap. 11.4. (Methoden) geschildert, durchgeführt. Das Eluat der Säule wurde in 1,44 ml-Fraktionen gesammelt und auf Enzymaktivität bzw. Proteinabsorption getestet.

12.4. Porengrößengradienten-Gelelektrophorese

Die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gradientengel-Elektrophorese (Porengrößengradient) wurde nach der von MARGOLIS und KENRICK (1968) beschriebenen Methode, verändert nach WOLF,

durchgeführt. Die Glasröhrchen (Ø = 6 mm, Höhe 12 cm) waren ca. 10 cm hoch mit dem linearen Gelgradienten (4 - 30% Acrylamid) gefüllt. Die Elektrophorese wurde in derselben Trennkammer und mit demselben Netzgerät, wie in Kap. 13 (Methoden) beschrieben, durchgeführt. Der Elektrodenpuffer hatte folgende Zusammensetzung:

Tris	10,75 g
Borsäure	5,04 g
EDTA	0,93 g
H_2O dest.	ad 1000 ml; pH 8,3

Die aufgetragenen Proben enthielten in 100 µl 50 µg normale Pyrocatechase, 100 µg Rinderserumalbumin (Boehringer Combithek) und 7% Saccharose. Es wurden 20 - 100 µl-Aliquots aufgetragen. Die Elektrophorese wurde eine Stunde lang bei einer konstanten Spannung von 100 V betrieben; danach wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Trennung war nach 24 Stunden beendet. Die Glasröhrchen wurden vorsichtig zerschlagen und die Gele entnommen. Einige wurden für die Aktivitätsbestimmung in 1 mm dicke Scheibchen zerschnitten (s. Kap. 2.2.5.4.). Die übrigen wurden in folgender Färbelösung 20 min inkubiert (nach VESTERBERG, 1972):

0,3 g Coomassie Brillant Blue R 250 in 75 ml Methanol gelöst
9,0 g Sulfosalizylsäure und 30 g Trichloressigsäure in 186 ml H_2O bidest. gelöst

Die Gele wurden 12 Stunden in 5%-iger Essigsäure entfärbt. Anschließend wurden die Wanderungsstrecken ausgemessen.

13. Analytische Gelelektrophorese

Die Reinheitskontrollen und R_f-Wert-Bestimmungen wurden nach der von MAURER (1968) beschriebenen Methode durchgeführt.

Standard-Gel (pH 7,5; 7,5%)

Die Polyacrylamid-Gele wurden aus folgenden Komponenten hergestellt:

a) 1 N HCl	48,0 ml	b) Acrylamid	30,0 g
Tris	6,85 g	Bis	0,8 g
Temed	0,46 ml		
c) Per	0,14 g		

Die unter a), b) und c) aufgeführten Substanzen wurden in H_2O bidest., Endvolumen jeweils 100 ml, gelöst. Die Lösungen wurden wie folgt gemischt: 1 Teil a), 2 Teile b), 1 Teil H_2O bidest. und 4 Teile c). Die mit Chromschwefelsäure gereinigten Glasröhrchen (Ø = 5 mm; Höhe = 7,5 cm) wurden mit 1,2 ml der Mischung gefüllt und sofort mit H_2O bidest. überschichtet, um Meniskusbildung zu vermeiden.

Die Röhrchen wurden in eine Trennkammer (Shandon Scientific Co. Ltd. London, England; Kapazität 8 Röhrchen) eingesetzt. Der Elektroden-Puffer (pH 7,0) bestand aus 5,52 g Diäthylbarbitursäure und 1 g Tris in 1 l H_2O bidest.. Als Netzgerät diente das Modell VoKam, SAE 2761 (Fa. Shandon Scientific Co. Ltd. London, England). Auf die Gele wurden 20 - 50 µl-Proben (≙ 20 - 100 µg Protein) aufgetragen, die Bromphenolblau als Markierungsfarbstoff enthielten und mit 2 M Saccharose beschwert waren. Die Bestimmungen wurden bei 4 °C und Raumtemperatur mit 2,5 mA/Röhrchen durchgeführt.

Auswertung der Elektrophorese

Nach dem Ende der Elektrophorese wurden die Gele sofort aus den Röhrchen entnommen. Einige wurden für die Aktivitätsbestimmung zerschnitten, die übrigen in einer 1%-igen Amidoschwarz 10 B-Lösung in 7%-iger Essigsäure 20 min lang gefärbt. Die Gele wurden in 7%-iger Essigsäure entfärbt und anschließend densitometrisch mit einem Flying Spot Densitometer (Fa. Vitatron, Holland) bei 609 nm ausgewertet.

14. Bestimmung der Temperaturoptima

Der Küvettenschlitten des Zeiss Spektralphotometers DMR 10 wurde unterhalb der Raumtemperatur mit einem Ultrakryomaten (Modell TK 30 D, Fa. Meßgerätewerk Lauda) und oberhalb der Raumtemperatur mit einem Tischthermostaten derselben Firma temperiert.

15. Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten von substituierten Muconsäuren

Die Reaktionsansätze zur Bildung substituierter Muconsäuren enthielten in 3 ml:

Tris-HCl pH 8,0	100 µmole
Mercaptoäthanol	10 µmole
Substituiertes Brenzcatechin	0,15 µmole
Chlorpyrocatechase	ca. 30 mE, bestimmt mit dem jeweiligen Substrat

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren enthielten die Referenzküvetten die gleichen Komponenten ohne Substrat.

16. Bestimmung der pK-Werte substituierter Brenzcatechine

In der Titrationskurve einer schwachen Säure mit einer starken Base gibt sich der pK-Wert als Wendepunkt zu erkennen. Die Pufferwirkung einer schwachen Säure ist am pK-Wert am größten, also Δ(pH) bei Zugabe von Lauge hier am kleinsten (EGGERT, 1968, S. 652).

Es wurden jeweils 10 ml von 10 mM wäßrigen Lösungen (mit 10% DMSO) der substituierten Brenzcatechine mit 50 µl-Aliquots einer 0,1 N NaOH titriert. Die pH-Änderung wurde mit einem pH-Meter (Modell Digi 610, Fa. WTW, Weilheim) gemessen. Der durch die Volumenzunahme bedingte Fehler ist kleiner als die Meßgenauigkeit der Methode. Aus den Auftragungen der Äquivalente

NAOH gegen den pH-Wert wurden an den ersten Wendepunkten die pK_s-Werte abgelesen.

17. Enzymatische Präparation von Fluor- und Brombrenzcatechinen in Lösung

Die Reaktionsansätze zur Darstellung von 3- und 4-Fluor- sowie 3-Brombrenzcatechin enthielten in 10 ml:

NAD^+	0,8 µmole	
DHB-DH (aus A. eutrophus)	2,0 ml	(≙ 1,8 Enzymeinheiten, gemessen mit dem jeweiligen Substrat)
Pyruvat	32,0 µmole	
Lactat-DH (2 mg/ml)	540,0 µl	
Substituiertes DHB	20,0 µmole	
Tris-HCl pH 8,0	0,33 mmole	
Mercaptoäthanol	33,3 µmole	

Die Reaktionsmischungen wurden bei Raumtemperatur inkubiert.

Chemikalien

Es wurden die handelsüblichen p. a. Chemikalien der Fa. Merck, Darmstadt, der Fa. Fluka/Fluka-Schuchardt, sowie die Biochemikalien der Fa. Boehringer und Söhne, Mannheim, verwendet. Außerdem wurden bezogen: Acrylamid, Bis, TEMED, Per, Amidoschwarz, Coomassie Brilliant Blue R 250 von Fa. Serva, Heidelberg. 3- und 4-Methylbrenzcatechin von Fa. EGA-Chemie, Steinheim (durch Sublimation gereinigt). Propanol zur Analyse (Fa. Merck) wurde vor der Verwendung in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie über eine 750 x 30 mm Kolonne redestilliert.

Folgende Chemikalien wurden dankenswerterweise zur Verfügung gestellt: Chlorbrenzcatechine und cis,cis-Muconsäure von Herrn M. HELLWIG, substituierte 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren von Herrn W. REINEKE und Porengrößengradienten-Gele von Herrn Dr. G. WOLF, Göttingen.

III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

1. Nachweis von zwei unterscheidbaren Pyrocatechaseaktivitäten in Pseudomonas Stamm B.13

Die Einflüsse der Halogensubstituenten auf die einzelnen Reaktionen des Benzoatabbaus sollten, um möglichst hohe Umsatzraten zu erzielen, an Enzymen mit geringer Substratspezifität untersucht werden. Diese Enzymeigenschaft war am ehesten bei den Bakterien zu erwarten, die auf Halogen- bzw. Methylaromaten wachsen können. Es wurde vergeblich versucht, bekannte Benzoat verwertende Bakterien auf m-Chlorbenzoat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle anzuziehen (DORN, 1973). Hierfür waren Bakterien aus drei taxonomischen Gruppen, Alcaligenes eutrophus Stamm 335, Pseudomonas arvilla C-1 und Acinetobacter calcoaceticus Stamm 1657, getestet worden. Pseudomonas arvilla mt-2 baut m- und p-Methylbenzoat über den meta-Weg ab (MURRAY et al.,1972). Es konnten zwar hohe Cooxidationsraten mit Halogenbenzoat gemessen, jedoch kein Wachstum beobachtet werden (REINEKE, 1976).

Daher wurde versucht, einen Organismus neu zu isolieren, der auf m-Chlorbenzoat wachsen konnte (DORN et al., 1974). Als Impfmaterial diente eine Probe aus der Göttinger Kläranläge. Nach Voranreicherung auf Benzoat und langsamem Ersetzen dieses Substrates durch m-Chlorbenzoat gelang es, ein Bakterium zu isolieren, welches auf Mineralmedium neben Benzoat auch m-Chlorbenzoat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten kann. Die Autoren wiesen mit Hilfe der Rothera-Reaktion nach, daß Benzoat über den β-Ketoadipinsäure-Weg abgebaut wird. In Versuchen zur taxonomischen Bestimmung wurde der Organismus als Pseudomonade identifiziert. Das Substratspektrum sowie zusätzliche Daten ließen keine widerspruchsfreie Klassifizierung zu. Der Organismus wurde vorläufig als Pseudomonas Stamm B.13 bezeichnet und in der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM) unter der Nr. DSM 426 geführt. Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden im wesentlichen mit diesem Organismus durchgeführt.

1.1. Wachstum von Pseudomonas Stamm B.13 auf Benzoat und m-Chlorbenzoat

Mit Hilfe der manometrischen Methode wurde nachgewiesen, daß auf Benzoat angezogene Zellen von Ps. Stamm B.13 m-Chlorbenzoat nicht veratmen können. Das ließ erwarten, daß den verschiedenen Anzuchtsbedingungen der Zellen unterschiedliche Enzymaktivitäten für chlorierte und unsubstituierte Substrate entsprechen. Daher wurde der Organismus auf Benzoat bzw. m-Chlorbenzoat in einem 10-l-Fermenter angezogen. Zu definierten Zeiten wurden Proben entnommen, von denen die Trübung ($A_{546\ nm}$) als Wachstumsparameter, Konzentration des Substrates, pH-Wert und beim Wachstum auf m-Chlorbenzoat die Chloridkonzentration bestimmt wurden. Ein Aliquot der Zellen wurde abzentrifugiert, gewaschen und aufgeschlossen. In den Rohextrakten wurden die Enzymaktivitäten für den Umsatz von Brenzcatechin und 3- und 4-Chlorbrenzcatechin bestimmt.

Die Zeit zur Verdopplung der Trübung während des exponentiellen Wachstums betrug bei Anzucht auf Benzoat 63 min und auf m-Chlorbenzoat 140 min. Die m-Chlorbenzoatkonzentration betrug 12,8 mM, die für Benzoat 13,9 mM. Korrigiert man die Endtrübungen der beiden Kulturen auf gleiche Substratkonzentrationen, so erkennt man, daß nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat nur 2/3 des Wertes der Benzoatkultur erreicht wird (s. Abb. 2 und 3). Bei Anzucht der Zellen unter den gleichen Bedingungen auf 10 mM Benzoat bzw. m-Chlorbenzoat wurde für das unsubstituierte Substrat eine Zellausbeute von 2,7 g Naßgewicht/l Kulturflüssigkeit und für m-Chlorbenzoat 1,7 g erzielt (vgl. Kap. 1.3.).

Da 100% des organisch gebundenen Chlors als Chlorid wiedergefunden wurden, ist auszuschließen, daß ein chlorhaltiger Metabolit entsteht, der nicht weiter verwertet werden kann. Mit der Abnahme des Substrates m-Chlorbenzoat ging eine Erniedrigung des pH-Wertes von 7,4 auf 6,9 einher. Die Oxidationsbilanz von m-Chlorbenzoat (Na-Salz) bei vollständiger Veratmung lautet:

$$C_7H_4O_2ClNa + 7\ O_2 \longrightarrow 7\ CO_2 + 2\ H_2O + NaCl$$

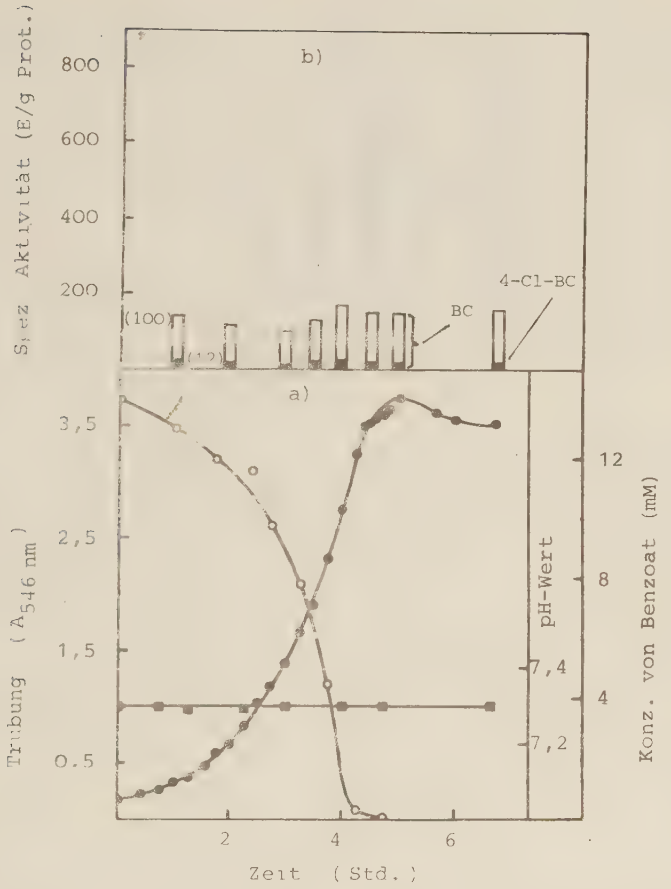


Abb. 2 Wachstum von Ps. Stamm B.13 mit Benzoat als Substrat

a) Die Zellen wurden, wie in Methoden Kap. 2.2. beschrieben, in einem 10 l-Fermenter angezogen. Die Mineralnährlösung enthielt 13,9 mM Benzoat. Während des Wachstums wurde der Verlauf der Trübung (A_{546nm}, ●——●), der Benzoatkonzentration (mit Hilfe der HPLC bestimmt, o——o) und des pH-Wertes (■——■) verfolgt.

b) Spezifische Aktivitäten der Pyrocatechasereaktion. Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 3.

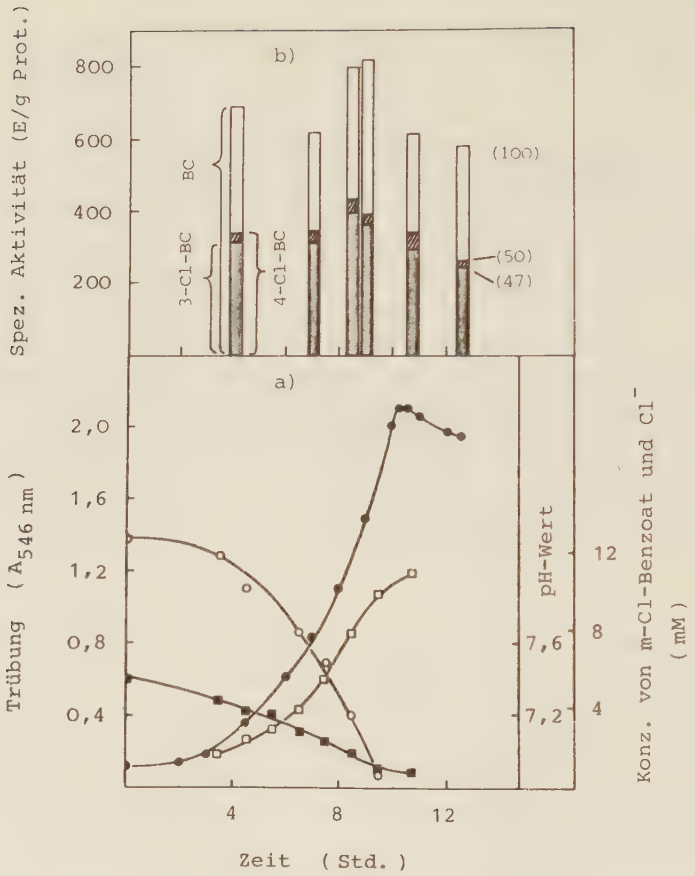


Abb. 3 Wachstum von Ps. Stamm B.13 mit m-Chlorbenzoat als Substrat

a) Die Versuchsbedingungen waren wie die in der Legende zu Abb. 2 beschriebenen. Zusätzlich wurde die Chloridkonzentration bestimmt (□——□). m-Chlorbenzoatkonzentration = 12,8 mM.
b) Nach bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen. In den zellfreien Extrakten wurden die spezifischen Aktivitäten der ortho-Spaltung von Brenzcatechin und Monochlorbrenzcatechinen gemessen. Die Zahlen in Klammern geben die relativen Aktivitäten mit den substituierten Substraten an. BC = Brenzcatechin ≙ 100%.

Da summarisch keine freie Salzsäure entstehen kann, mußte das Absinken des pH-Wertes mit der Ausscheidung einer organischen Säure begründet werden, die dann nicht zur Synthese von Zellsubstanz genutzt wurde. Dagegen blieb in der Benzoat-Kultur die Wasserstoffionenkonzentration konstant, was einer vollständigen Ausnutzung des Substrates entspricht. Diese Tatsachen machten es notwendig, bei der Anzucht von Ps.Stamm B.13 bis zu Trübungswerten von $A_{546\ nm}$ = 14 parallel zur kontinuierlichen Zuspeisung von m-Chlorbenzoat äquimolare Mengen NaOH zuzugeben (vgl. Kap. 2.2. Methoden). Bis zu einer Konzentration von 40 mM m-Chlorbenzoat konnte kein hemmender Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet werden.

Die relativen Aktivitäten der Ringöffnungsreaktion für Monochlorbrenzcatechine verglichen mit Brenzcatechin in den zellfreien Extrakten der Proben zeigten, daß nur Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat hohe Pyrocatechaseaktivität mit den chlorierten Substraten besaßen (Abb. 2 und 3). Die spezifischen Aktivitäten mit Brenzcatechin lagen in den auf m-Chlorbenzoat angezogenen Zellen drei- bis viermal höher als in Zellen nach Anzucht auf Benzoat. Die zellfreien Extrakte dieser Zellen wiesen mit 3-Chlorbrenzcatechin eine mittlere Aktivität von nur 0,6% bezogen auf Brenzcatechin auf. Die höchsten spezifischen Aktivitäten wurden für beide Zellarten am Ende des exponentiellen Wachstums gemessen. Die unterschiedlichen relativen Umsatzraten der Chlorbrenzcatechine, verglichen mit Brenzcatechin, nach den verschiedenen Anzuchtsbedingungen deuten bei der Verwertung von m-Chlorbenzoat auf die Synthese einer zusätzlichen Pyrocatechase hin, welche im folgenden als Chlorpyrocatechase bezeichnet werden soll (Definition siehe Kap. 1.5.).

1.2. Induzierbarkeit der Chlorpyrocatechase

Um die Induzierbarkeit der Chlorpyrocatechase zu prüfen, wurden Zellen nach Anzucht auf Benzoat bei An- und Abwesenheit von Chloramphenicol mit m-Chlorbenzoat inkubiert.

Tab. 1 Induktion der Chlorpyrocatechase in Pseudomonas Stamm B.13

Test-substrat	Inkubation von auf Benzoat angezogenen Zellen mit folgenden Zusätzen: 1. 2 mM Benzoat 2 mM Chloramphenicol	2. 2 mM Benzoat	3. 2 mM m-Chlorbenzoat 2 mM Chloramphenicol	4. 2 mM m-Chlorbenzoat
	Spezifische Aktivität (E/g Protein)			
BC	182	174	171	190
4-Cl-BC	20,0	18,3	19,2	34,8
3-Cl-BC	1,0	1,0	1,0	14,0
	Aktivität in %; mit BC jeweils 100%			
BC	100	100	100	100
4-Cl-BC	11,0	10,5	11,2	18,3
3-Cl-BC	0,55	0,6	0,6	7,4

Die Zellen wurden zweimal mit dem Phosphatpuffer der Nährlösung gewaschen und zu einem Zelltiter von 4×10^8 Zellen/ml in kompletter Mineralnährlösung aufgenommen. In 2 l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden jeweils 400 ml Zellsuspension mit den verschiedenen Zusätzen bei 30 °C vier Stunden lang inkubiert. In den zellfreien Extrakten wurden die spezifischen Aktivitäten der Pyrocatechasereaktion gemessen.

Längere Induktionszeiten führten zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Die Ansätze färbten sich dann blauviolett, was auf die Ausscheidung von Brenzcatechinen zurückzuführen war. Während der Inkubation stieg die Zellzahl in Ansatz 2 (s. Tab. 1) auf das Siebenfache des Anfangswertes an. Die Zellen wuchsen demnach ohne Verzögerung weiter. Zellzahl und Trübung der anderen Ansätze blieben nahezu konstant. Die Steigerung der Pyrocatechaseaktivität mit 3-Chlorbrenzcatechin in Ansatz 4 auf das Zwölffache des Wertes von Ansatz 3 (s. Tab. 1) mit Chloramphenicol machte deutlich, daß für den Zugewinn der Chlorpyrocatechase-

aktivität Proteinsynthese notwendig war. Eine Reaktivierung von schon vorhandenem Enzym war demnach auszuschließen.

1.3. DEAE-Zellulosechromatographie der Rohextrakte aus Zellen nach Anzucht auf Benzoat bzw. m-Chlorbenzoat

Zum Nachweis zweier Pyrocatechaseaktivitäten bei m-Chlorbenzoat verwertenden Zellen wurden Rohextrakte von diesen mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie fraktioniert. Zum Vergleich wurden auch Zellen einer Benzoatkultur untersucht.Die Kulturen wurden jeweils in einem 10 l-Fermenter auf 10 mM Substrat angezogen. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und sofort aufgeschlossen. Die Zellausbeute betrug beim Wachstum auf Benzoat 2,7 g Naßgewicht und auf m-Chlorbenzoat 1,7 g Naßgewicht/l Kulturflüssigkeit. Die Rohextrakte wurden jeweils gleich auf eine DEAE-Zellulosesäule aufgetragen.

In beiden Elutionsdiagrammen von Abb. 4 erkennt man bei einer 0,22 molaren NaCl-Konzentration einen Pyrocatechaseaktivitätspeak mit Brenzcatechin als Testsubstrat. Die durchschnittliche Aktivität dieser Fraktionen mit 3-Chlorbrenzcatechin betrug 0,8% und mit 4-Chlorbrenzcatechin 10,9% bezogen auf die Umsatzgeschwindigkeit mit Brenzcatechin (= 100%). In beiden Diagrammen erscheint die DHB-Dehydrogenaseaktivität an der gleichen Stelle. Bei der Fraktionierung des zellfreien Extraktes von auf m-Chlorbenzoat angezogenen Zellen wurde eine zweite Pyrocatechase bei niederer Ionenstärke (0,13 M NaCl) eluiert, die folgende relative auf Brenzcatechin bezogene (= 100%) Aktivitäten aufwies: mit 3-Chlorbrenzcatechin 104,6% und mit 4-Chlorbrenzcatechin 96%. Bei der Anzucht von Pseudomonas Stamm B.13 auf m-Chlorbenzoat waren demnach gleichzeitig zwei Pyrocatechasen induziert worden, die unterschiedliche Abbauleistungen mit substituierten Brenzcatechinen aufwiesen und an DEAE-Zellulose deutlich voneinander getrennt worden waren. Die Chlorpyrocatechase ist nur in Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat induziert.

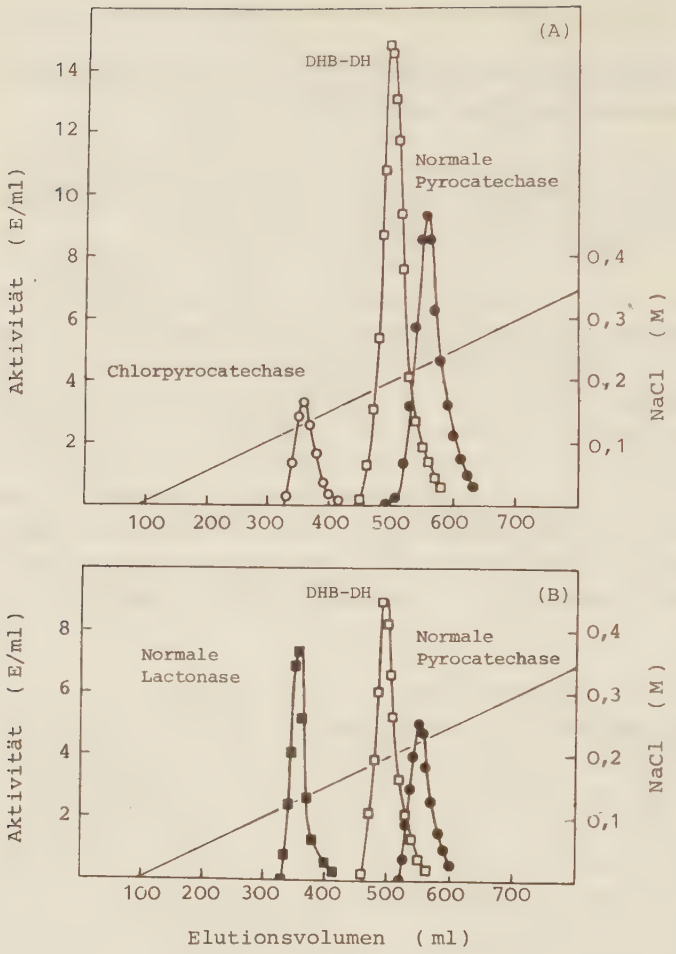


Abb. 4 Fraktionierung der Rohextrakte aus Zellen nach Anzucht auf Benzoat (B) bzw. m-Chlorbenzoat (A) an DEAE-Zellulose

Versuchsdurchführung siehe Methoden Kap. 11.2.. Das Probevolumen des Rohextraktes von auf m-Chlorbenzoat angezogenen Zellen betrug 13,5 ml (≙ 1,1 g Protein), dasjenige von auf Benzoat angezogenen Zellen 19,5 ml (≙ 1,6 g Protein). Es wurde bei einem mittleren Arbeitdruck von 35 cm Wassersäule eluiert. Die Flußgeschwindigkeit betrug 6,2 ml/15 min (≙ 1 Fraktion).

Auf Benzoat angezogene Zellen enthielten eine Lactonase (s. Tab. 2), die mit synthetischer und enzymatisch gebildeter cis,cis-Muconsäure reagierte, jedoch keine Aktivität mit enzymatisch synthetisierter α- oder β-Chlormuconsäure (s. Methoden Kap. 15) aufwies.

Tab. 2 Spezifische Aktivitäten dreier am Benzoat- bzw. m-Chlorbenzoatabbau beteiligter Enzyme nach Anzucht auf Benzoat bzw. m-Chlorbenzoat

Enzymaktivität	Testsubstrat	Wachstumssubstrat Benzoat	m-Chlorbenzoat
DHB-DH	DHB	370	600
Pyrocatechase	Brenzcatechin	177	640
	3-Cl-Brenzcatechin	1,2	121
	4-Cl-Brenzcatechin	19,6	172
Lactonase	cis,cis-Muconsäure	246	13,5
	α-Cl-Muconsäure	0,01	210

Aktivitätsangaben in E/g Protein. Zusammensetzung der Enzymtests siehe Methoden.

Diese sehr hohe Spezifität der cis,cis-Muconsäure lactonisierenden Enzyme ist aus der Literatur hinreichend bekannt (ORNSTON, 1966b). Im Gegensatz dazu zeigten Rohextrakte von auf m-Chlorbenzoat angezogenen Zellen hohe Aktivitäten mit α- und β-Chlormuconsäuren, nicht aber mit unsubstituiertem Substrat. Beide Lactonaseaktivitäten benötigen wie die Enzyme aus anderen Organismen (ORNSTON, 1966b) Mn^{2+} und ließen sich mit EDTA durch Komplexierung des Cofaktors hemmen. Die Chlormuconsäure lactonisierenden Enzyme aus Arthrobacter sp. SHARPEE et al., 1973) und Pseudomonas N.C.I.B. 9340 (GAUNT und EVANS, 1971) sind sehr empfindlich gegen Chromatographie und Verdünnung. Sie werden durch Abtrennung des Mangan-Ions zum größten Teil irreversibel desaktiviert. Das wäre eine Erklärung für die beobachtete In-

stabilität der "Chlorlactonase" bei Chromatographie an DEAE-Zellulose.

Die normale Lactonase war in Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat nicht vorhanden. Dieses Enzym war gegen Ionenaustauschchromatographie relativ beständig. Wegen der extremen Hitzestabilität, welche auch für die Lactonase aus Pseudomonas putida (ORNSTON, 1966b) beschrieben wurde, konnte das Enzym durch einen Hitzeschritt von 10 min bei 80 °C aus Rohextrakt sechsfach angereichert werden. Die genannten Eigenschaften schlossen aus, daß das Enzym in Zellen, angezogen auf m-Chlorbenzoat, zwar vorhanden war, beim Aufschluß aber desaktiviert wurde.

1.4. Umsetzung von α- und β-Chlormuconsäure mit Rohextrakt aus Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat

Zu Untersuchungen über das Schicksal der beim Abbau von m-Chlorbenzoat entstehenden Chlormuconsäuren wurden folgende Experimente durchgeführt. Mit teilweise gereinigter Chlorpyrocatechase wurden 3- und 4-Chlorbrenzcatechin zu den entsprechenden Chlormuconsäuren umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktionen (A_{260nm} = konstant) wurden die Spektren von α-Chlormuconsäure (ε_{267nm} = 18300) und β-Chlormuconsäure (ε_{259nm} = 12500) registriert. Zu den genannten Ringspaltungsprodukten wurde jeweils Rohextrakt aus Zellen gegeben, die auf m-Chlorbenzoat angezogen worden waren. Die Reaktionsansätze enthielten kein Mercaptoäthanol. Nachdem die Extinktion bei 243 nm , dem Extinktionsmaximum der Produkte, konstant blieb, wurden die Absorptionsspektren aufgenommen (s. Abb. 5).

Die Reaktionsansätze, ausgehend von 3- und 4-Chlorbrenzcatechin, zeigten identische Spektren. Unter der Annahme, daß die eingesetzten Substratmengen vollständig zu den Produkten mit dem Absorptionsmaximum bei 243 nm umgesetzt wurden, errechnete sich ein molarer Extinktionskoeffizient von ε_{243nm} = 5300 in 33,3 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 8,0. Der äquimolare Umsatz von 5-Oxo-$\Delta^{2(5H),\alpha}$-furan-2-essigsäure (s. Abb. 32) unter gleichen Be-

dingungen führte ebenfalls zu einer Substanz mit identischem Spektrum (vgl. Diskussion).

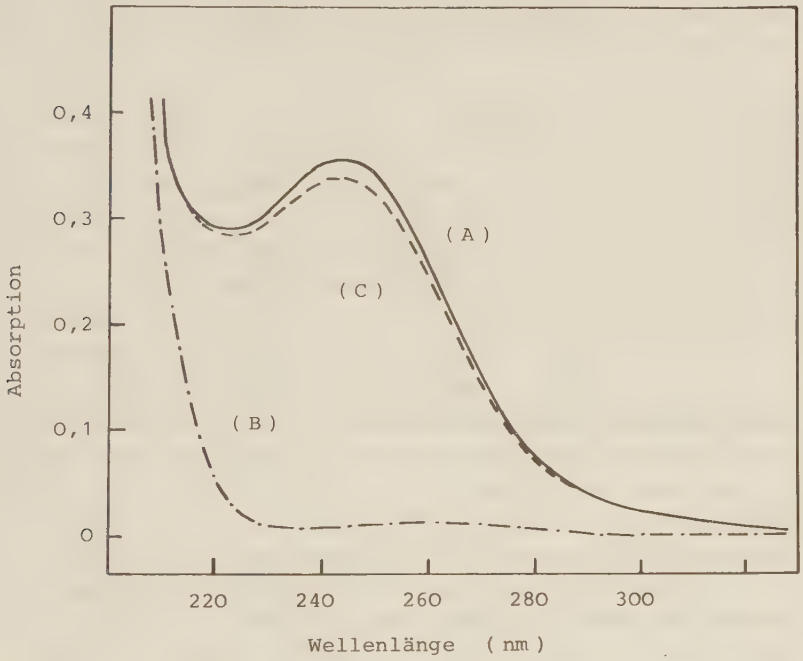


Abb. 5 UV-Spektren der enzymatisch hergestellten Abbauprodukte von α- und β-Chlormuconsäure und 5-Oxo-$\Delta^{2(5H),\alpha}$-furan-2-essigsäure bei sauren und alkalischen pH-Werten

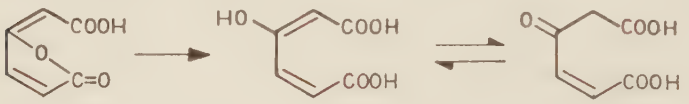
Die Reaktionsansätze enthielten in 3 ml: 100 µmole Tris-HCl pH 8,0, 50 µl Chlorpyrocatechaselösung (≙ 45 µg Protein), 50 µl Rohextrakt aus Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat (110 µg Protein) und 0,2 µmole Substrat. Die Referenzküvetten enthielten die gleichen Komponenten außer dem Substrat.

A Unbehandelte Reaktionsmischung

B Mit 50 µl 2 N HCl auf pH 1,5 angesäuerte Mischung

C Angesäuerter Ansatz (B) nach Zugabe von 70 µl 3,5 N KOH, pH 12,4

Das Absorptionsmaximum bei 243 nm verschwand nach Ansäuern auf pH 1,5 und konnte nach Zugabe von KOH (pH 12,5) wieder hergestellt werden. Die gleichen Beobachtungen beschrieben EVANS et al. (1971a,b) und GAUNT und EVANS (1971) beim Abbau von verschieden substituierten β-Chlormuconsäuren. Die pH-abhängige reversible Veränderung der UV-Spektren wurde als Keto-Enol-Tautomerie (KNOX und EDWARDS, 1955) der Maleylacetate gedeutet.



5-Oxo-$\Delta^{2(5H),\alpha}$-furan-2-essigsäure	β-Hydroxymuconsäure	Maleylacetat
bei pH 7,0	bei pH 8,0	bei pH 1,5
ε_{277nm} = 15000	λ_{max} = 243 nm	λ_{max} < 210 nm

Die Substanz mit dem Absorptionsmaximum bei 243 nm konnte mit Rohextrakt bei Zugabe von 10 µmolen Mercaptoäthanol zu dem 3 ml-Ansatz weiter umgesetzt werden.

Zur weiteren Analyse der Abbauprodukte von 3- und 4-Chlorbrenzcatechin wurden diese in folgenden Reaktionsmischungen umgesetzt: In 3 ml waren enthalten: 100 µmole Tris-HCl, pH 8,0, 100 µl Rohextrakt aus Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat (220 µg Protein) und jeweils 3 µmole Chlorbrenzcatechin. Nach dem Ende der Reaktion (A_{243nm} = konstant) wurden je 4 µl der Reaktionsmischungen mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer "reverse phase"-Säule chromatographiert.

Die Chromatogramme der Reaktionsmischungen, ausgehend von 3- bzw. 4-Chlorbrenzcatechin, wiesen nur einen Peak auf, der in den Chromatogrammen der Kontrollansätze nicht vorhanden war. Retentionszeit und Peakfläche stimmten überein. Wegen der sehr kleinen Retentionszeit ist die Identität der Reaktionsprodukte aus 3- und 4-Chlorbrenzcatechin nicht gesichert. Andererseits entspräche die hohe Polarität der Reaktionsprodukte durchaus dem

Maleylacetat, welches sehr gut wasserlöslich ist und kaum mit Äthylacetat extrahiert werden kann (EVANS et al., 1971a). Die Befunde legen eine Konvergenz der Abbauwege von 3- und 4-Chlorbrenzcatechin auf der Stufe von β-Hydroxymuconsäure nahe.

1.5. Zusammenfassung

Die unter Punkt 1. beschriebenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Für eine Verdopplung der Trübung benötigte Pseudomonas Stamm B.13 beim Wachstum auf Benzoat 60, auf m-Chlorbenzoat 140 min.
2. Die Zellausbeute war mit unsubstituiertem Substrat um etwa 50% höher als mit m-Chlorbenzoat. Nach dem Verbrauch von 13 mM m-Chlorbenzoat sank der pH-Wert von 7,4 auf 6,9 ab. Bei Anzucht auf Benzoat blieb der pH-Wert konstant.
3. Ps. Stamm B.13 bildet beim Wachstum auf Benzoat die normale Pyrocatechase, bei Anzucht auf m-Chlorbenzoat zusätzlich die Chlorpyrocatechase, welche den raschen Umsatz der Monochlorbrenzcatechine ermöglicht.
4. Rohextrakte von auf Benzoat angezogenen Zellen wiesen hohe Lactonaseaktivitäten mit unsubstituierter Muconsäure und nur Spuren mit Chlormuconsäuren auf. Nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat waren hohe Aktivitäten mit Chlormuconsäuren feststellbar; das unsubstituierte Substrat wurde dagegen nur sehr langsam umgesetzt.

Definition: Zur Unterscheidung der beiden Pyrocatechasen aus Pseudomonas Stamm B.13 wurden folgende Trivialnamen geprägt:

Chlorpyrocatechase bezeichnet die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase, welche hohe relative Umsatzraten mit Monochlorbrenzcatechinen besitzt (BC 100%; 3-Cl-BC 105%; 4-Cl-BC 96%) und in Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat nachgewiesen wurde, nicht aber nach Kultivierung auf Benzoat.

Mit normaler Pyrocatechase ist das Enzym gemeint, welches bei Anzucht auf Benzoat und m-Chlorbenzoat induziert ist und niedrige relative Umsatzraten mit

Monochlorbrenzcatechinen besitzt (BC 100%; 3-Cl-BC 0,7%; 4-Cl-BC 11%).

Die Trivialnamen beinhalten keine systematische Zuordnung. Da die Enzymfunktion aus den Namen deutlich hervorgeht, werden diese bis zur endgültigen Klassifizierung weiter verwendet.

2. Anreicherung und Charakterisierung der zwei Pyrocatechasen aus Pseudomonas Stamm B.13

Zur genaueren Unterscheidung der beiden Pyrocatechasen wurde eine weitere Anreicherung der beiden Enzyme versucht. Danach sollte geprüft werden, ob sich die kinetischen Eigenschaften während der Anreicherung verändern.

2.1. Anreicherung der Pyrocatechasen aus Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat

Zur Gewinnung größerer Zellmengen wurde Ps. Stamm B.13 in einem 10 l-Fermenter bis zu einer Trübung von A_{546nm} = 14 angezogen. Trotz hoher Zelldichte und starker Schaumbildung, die durch Zuspeisung von Octanol unterdrückt wurde, verlief das Wachstum streng exponentiell. Zum Zeitpunkt der Ernte enthielt die Kulturflüssigkeit noch 3,5 mM m-Chlorbenzoat. Die Zellausbeute betrug 19,5 g Naßgewicht/l. Die Zellen wurden mit der Frenchpresse aufgeschlossen.

Eine direkte Abtrennung der Nukleinsäuren aus dem Rohextrakt gelang nicht, ohne die Chlorpyrocatechase völlig zu inaktivieren. Es wurden die Fällungsmethoden mit Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid (CTAB), Streptomycinsulfat und Protaminsulfat in Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0) verwendet. Der Versuch einer Voranreicherung durch Ammoniumsulfatfraktionierung führte ebenfalls zu einem hohen Aktivitätsverlust der Chlorpyrocatechase. Beide Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 waren hitzelabil wie auch die Enzyme aus Pseudomonas fluorescens (SEIDMAN et al., 1969) und Pseudomonas desmolyticum (TRECCANI et al., 1968).

2.1.1. Fraktionierung des Rohextraktes aus Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat an DEAE-Zellulose

Da sich die Methoden der Voranreicherung als ungeeignet erwiesen, wurden 71 ml Rohextrakt (≙ 5,9 g Protein) ohne Vorbehandlung an einer DEAE-Zellulose-Säule aufgetrennt.

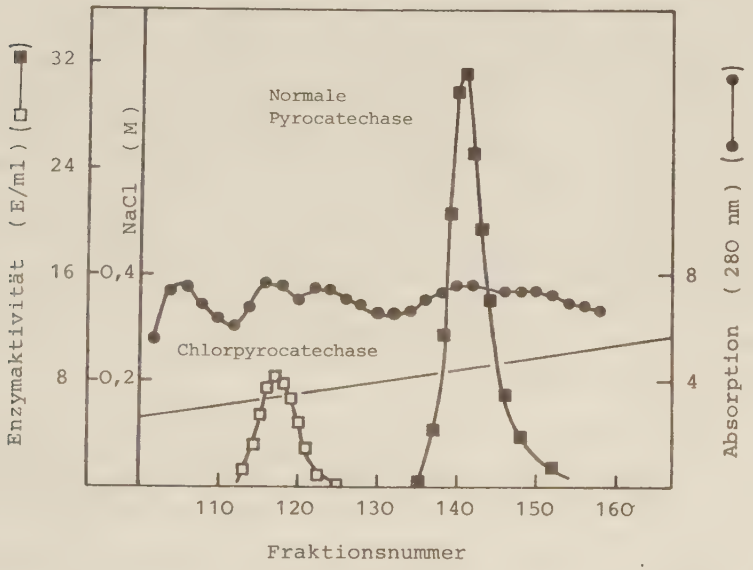


Abb. 6 Chromatographie des Rohextraktes aus Ps. Stamm B.13-Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat an DEAE-Zellulose

Zur Versuchsdurchführung siehe Kap. 11.2. (Methoden). Es wurde bei einem mittleren Arbeitsdruck von 43 cm Wassersäule eluiert. Die Flußgeschwindigkeit betrug 9,4 ml/15 min (≙ 1 Fraktion). Der Proteingehalt der Fraktionen wurde als Absorption bei 280 nm in Küvetten mit 1 cm Lichtweg bestimmt.

Der Rohextrakt war bräunlich gelb gefärbt. Während der Auftrennung wurde schon bei sehr niedriger Ionenstärke eine rotgefärbte Bande sichtbar. Diese konnte auf Grund ihres Absorptionsspektrums

als ein Cytochrom vom c-Typ erkannt werden. Bei Erhöhung der NaCl-Konzentration konnten zwei weitere rotgefärbte Banden, zwischen denen eine gelbe wanderte, beobachtet werden. Beim Ausmessen der Aktivitäten in den Fraktionen zeigte sich, daß die Intensität der roten Farbe mit den Aktivitäten der beiden Pyrocatechasen korrelierte. Eine Quantifizierung der Absorption zwischen 400 und 500 nm war wegen der Überlagerung durch die gelbe Flavinbande nicht möglich.

Wie für die normale Pyrocatechase nach 29-facher Anreicherung noch genauer nachgewiesen werden konnte (s. Kap. III.2.2.7.), zeigten beide Enzyme die für 1,2-Dioxygenasen typische rote Farbe. Sie deutet auf das Vorhandensein des Nicht-Häm-Eisen-Protein-chromophors hin, bei welchem das Zentralatom in der Oxidationsstufe des Fe(III) vorliegt (NOZAKI, 1974). Das breite Absorptionsmaximum zwischen 400 und 500 nm geht mit der Desaktivierung der 1,2-Dixygenasen verloren (KOJIMA et al., 1967). Dies sei schon an dieser Stelle erwähnt, da eine Anreicherung der Chlorpyrocatechaseaktivität nicht gelang. Somit war für die Chlorpyrocatechase kein genauerer spektroskopischer Nachweis des Nicht-Häm-Eisen-Proteins möglich.

In Abb. 6 ist ein typisches Elutionsdiagramm dargestellt. Im Verlauf der Anreicherung stellte sich heraus, daß die Chlorpyrocatechase kältelabil war (s. Kap. III.2.2.2.). Während der Lagerung des Enzyms bei Raumtemperatur nahm die Aktivität nur sehr langsam ab. Dagegen verlief die Desaktivierung bei 4 ^{o}C sehr viel schneller. Daher wurden alle weiteren Versuche mit der Chlorpyrocatechase nach der Abtrennung von der normalen Pyrocatechase bei Raumtemperatur durchgeführt. Die aktivsten Fraktionen der beiden Enzyme im Eluat der DEAE-Zellulosechromatographie wurden vereinigt und mit Hilfe der Ammoniumsulfatfällung und anschließender Dialyse konzentriert.

Durch diesen ersten Anreicherungsschritt war die normale Pyrocatechase mit einer Ausbeute von 70% zehnfach angereichert worden. Das so erhaltene Enzympräparat wurde durch Zugabe von NaN_3 zu

einer Konzentration von 0,05% gegen Bakterienbewuchs geschützt und bis zur weiteren Anreicherung bei 4 °C aufbewahrt. Innerhalb von vier Monaten konnte noch kein Akivitätsverlust festgestellt werden.

2.1.2. Versuche zur Anreicherung der Chlorpyrocatechase

Während des ersten Reinigungsschrittes verringerte sich die spezifische Aktivität der Chlorpyrocatechase auf 80% des Ausgangswertes. Gleichzeitig wurden etwa 70% der Enzymaktivität zerstört. Führte man die Ionenaustauschchromatographie des Rohextraktes bei Raumtemperatur durch, so wurden Ausbeute und Anreicherung etwas verbessert. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, betrug die relative Ausbeute bei der Chromatographie an DEAE-Zellulose bei 4 °C 31% und bei Raumtemperatur 52%. Die Konzentrierung von Chlorpyrocatechaselösungen mit Hilfe der Diaflo-Kammer führte zu höheren Verlusten als die Fällung mit Ammoniumsulfat mit anschließender Dialyse. Die Verwendung von Phosphat- anstelle von Tris-HCl-Puffer bei den getesteten Chromatographiemethoden und bei Dialyse konnte die Inaktivierung ebensowenig verhindern wie das Arbeiten bei verschiedenen pH-Werten. Die Zugabe von Eisen(II)- und Eisen(III)-Salzen zum Dialyse-Puffer oder anaerobe Dialyse in Gegenwart von Eisen(II)-ammoniumsulfat und Na-Thiosulfat hatten keinen Einfluß auf die Stabilität der Chlorpyrocatechase.

Beim zweiten DEAE-Zellulose-Lauf (s. Abb. 7) konnte die spezifische Aktivität, verglichen mit derjenigen in der aufgetragenen Probe, verdoppelt werden. Die anschließende Konzentrierung mit Ammoniumsulfatfällung und Dialyse (s. Kap. II.11.1.) veränderte die spezifische Aktivität nicht, reduzierte jedoch die Gesamtaktivität um 50%.

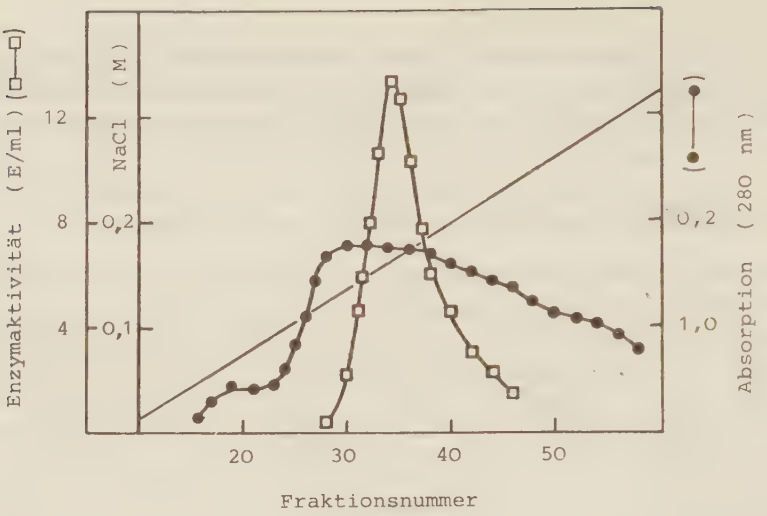


Abb. 7 Zweite DEAE-Zellulosechromatographie von Chlorpyrocatechase bei Zimmertemperatur

Zur Versuchsdurchführung siehe Kap. 11.2. (Methoden). Die Fraktionsgröße betrug 90 Tropfen/12 min entsprechend 4,8 ml.

Für einen weiteren Versuch zur Anreicherung der Chlorpyrocatechase wurde die Chromatographie an DEAE-Sephadex verwendet. Abb. 8 stellt das Elutionsdiagramm dieses Reinigungsschrittes dar. Bei dieser Methode mit den kombinierten Trennprinzipien Ionenaustausch und Gelfiltration nach Molekülgröße wurde die Enzymaktivität zum größten Teil zerstört. Wie aus Tab. 3 zu entnehmen ist, verringerte sich die spezifische Aktivität auf etwa die Hälfte. Die Ausbeute allein in diesem Schritt betrug nur 14%. Mit diesem Enzympräparat wurden die Kontrollkinetiken (s. Kap. III. 3.4.2.) und die Gelelektrophorese zur R_f-Wert-Bestimmung (s. Kap. III. 2.2.1.) durchgeführt.

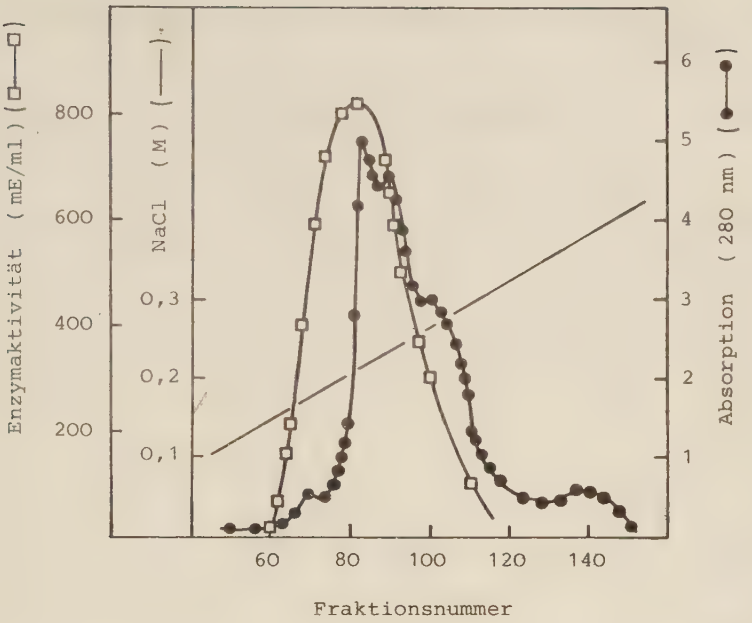


Abb. 8 DEAE-Sephadexchromatographie der Chlorpyrocatechase

Zur Versuchsdurchführung siehe Kap. 11.3. (Methoden). Die Säule war zu Beginn der Chromatographie 32 cm hoch mit DEAE-Sephadex gefüllt. Es wurde bei einem mittleren Arbeitsdruck von 35 cm Wassersäule eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 6,6 ml/8,5 min (≙ 1 Fraktion). Am Ende der Chromatographie war das Gelbett auf die halbe Höhe des Anfangswertes geschrumpft.

Tab. 3 Anreicherung der Chlorpyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (E)	Spezif. Aktivität (E/g Prot.)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Rohextrakt	71	5900	1400	244	100	1
1.DEAE-Zellulose-Säule	132	2300	448	195	31	0,8
$(NH_4)_2SO_4$-Fällung +Dialyse	17	1240	274	221	19	0,9
2.DEAE-Zellulosesäule	86	326	142	435	9,8	1,8
$(NH_4)_2SO_4$-Fällung +Dialyse	24	174	77	442	5,3	1,8
DEAE-Sephadex-Säule	80	59	11	187	0,8	0,8
$(NH_4)_2SO_4$-Fällung +Dialyse	4	23	8	348	0,55	1,4

2.1.3. Anreicherung der normalen Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13

2.1.3.1. Wiederholte DEAE-Zellulosechromatographie mit normaler Pyrocatechase

Zur weiteren Reinigung der normalen Pyrocatechase wurde das aus der ersten DEAE-Zellulosechromatographie erhaltene Enzympräparat noch einmal an dem Ionenaustauscher DE 52 chromatographiert. Durch die Fraktionierung mit einer kleinen Säule sollte vor allem die Gesamtproteinmenge verringert werden. Damit konnte anschließend für die weitere Anreicherung die Gelfiltration verwendet werden.

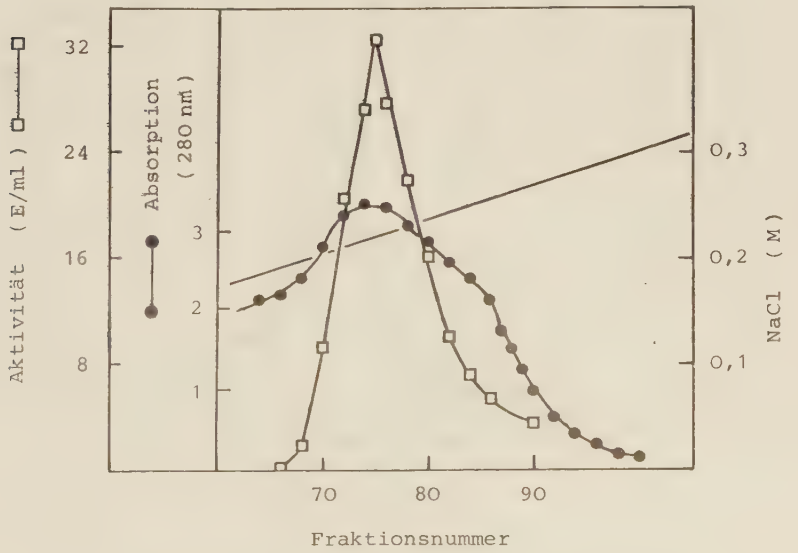


Abb. 9 Zweite DEAE-Zellulosechromatographie der normalen Pyrocatechase

Zur Versuchsdurchführung siehe Kap. 11.2. (Methoden). Die Flußrate betrug 6,5 ml/15 min (≙ 1 Fraktion).

Im zweiten DEAE-Zellulose-Lauf konnte die spezifische Aktivität der normalen Pyrocatechase auf den 14-fachen Wert gesteigert werden, verglichen mit derjenigen des Rohextrakts. Wie aus Tab. 4 auch hervorgeht, gingen allein bei diesem Schritt 61% der Aktivität und 73% des Proteins, bezogen auf die Werte für die aufgetragene Probe, verloren. Beim Einengen durch Ammoniumsulfat-Fällung und anschließende Dialyse blieben die spezifische und die Gesamtaktivität etwa konstant.

2.1.3.2. Chromatographie an DEAE-Sephadex

Zur weiteren Anreicherung wurde das Dialysat auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen.

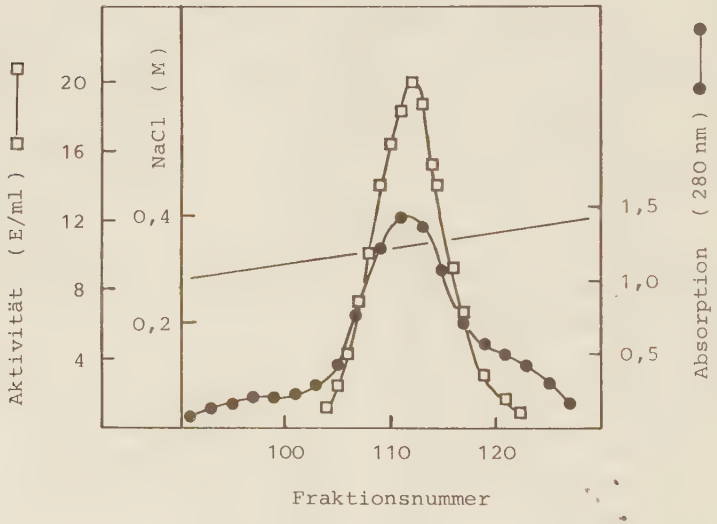


Abb. 10 DEAE-Sephadexchromatographie mit der normalen Pyrocatechase

Die Versuchsbedingungen waren den in der Legende zu Abb. 8 beschriebenen gleich.

Aus Abb. 10 geht hervor, daß sich der Hauptproteinpeak und die Aktivitätsbande decken. Lediglich an den unteren Enden der Proteinschenkel sind noch Begleitproteine zu erkennen. Die aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert. Durch diesen Schrit wurde die spezifische Aktivität auf das Zwanzigfache des Wertes für den Rohextrakt erhöht. Bezogen auf die Werte für die aufgetragene Probe verringerte sich die Gesamtaktivität nur um 13%, dagegen nahm die Proteinmenge um41% ab.

2.1.3.3. Sephadex G 200-Gelfiltration

Als letzter Schritt zur Reinigung der normalen Pyrocatechase wurde eine Sephadex G 200-Gelfiltration durchgeführt.

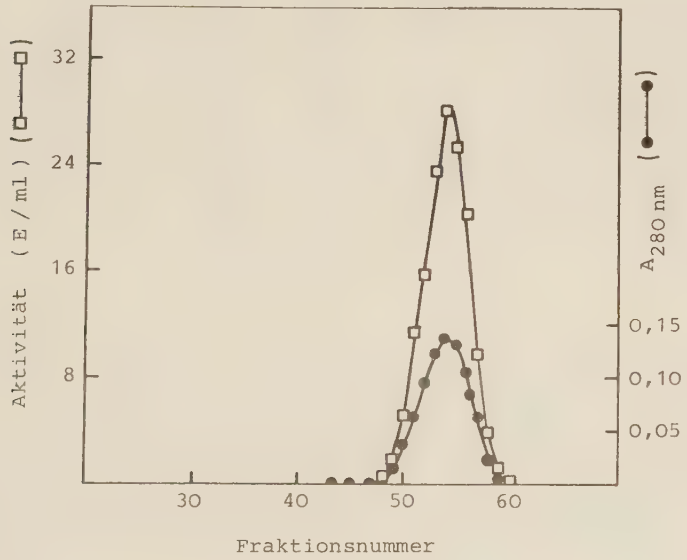


Abb. 11 Sephadex G 200-Gelfiltration mit der normalen Pyrocatechase

Zur Versuchsdurchführung siehe Kap. 11.4. (Methoden). Es wurde bei einem konstanten Arbeitsdruck von 1.5 cm Wassersäule eluiert. Die Durchflußrate betrug 5,9 ml/15 min (≙ 1 Fraktion).

Aus Abb. 11 ist ersichtlich, daß nur ein Proteinpeak eluiert wurde, der sich mit dem Verlauf der Enzymaktivität in den Fraktionen deckte. Das Verhältnis von Aktivität zu Proteinkonzentration ist in den einzelnen Fraktionen etwa konstant. Nach der letzten Anreicherungsstufe betrug die spezifische Aktivität 19,9 E/mg Protein, was einem Gesamtanreicherungsfaktor von 29 entspricht.

Tab. 4 Anreicherung der normalen Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (E)	Spezif. Aktivität (E/g Prot.)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Rohextrakt	71	5900	4060	688	100	1
1.DEAE-Zellulose-Säule	32	416	2820	6780	69,4	9,9
2.DEAE-Zellulose-Säule	9,7	114	1097	9610	27,0	14
DEAE-Sephadex-Säule	8,3	67,3	954	14200	23,4	20,6
Sephadex G 200-Gelfiltration	7,6	45,6	910	19900	22,4	29

Die Werte für den Anreicherungsfaktor und die maximale spezifische Aktivität liegen in der gleichen Größenordnung wie die in der Literatur für Pyrocatechasen aus anderen Bakterien beschriebenen. KOJIMA et al. (1967) reicherten die Pyrocatechase aus Pseudomonas arvilla C-1 um das 40-Fache zu einer spezifischen Aktivität von 29,6 E/mg Protein an; NAKAGAWA et al. (1963) erreichten für das Enzym aus Brevibacterium fuscum nach 39-facher Anreicherung eine spezifische Aktivität von 19,3 E/mg Protein.

2.2. Charakterisierung der beiden Pyrocatechasen aus Pseudomonas Stamm B.13

Der Besitz der Chlorpyrocatechase unterscheidet Pseudomonas Stamm B.13 von allen "gewöhnlichen" Benzoatverwertern. Nach dem unterschiedlichen chromatographischen Verhalten der beiden Pyrocatechasen an DEAE-Zellulose sollten noch zusätzliche Eigenschaften untersucht und jeweils miteinander verglichen werden.

2.2.1. Reinheitskontrolle und Bestimmung der R_f-Werte bei der Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine allgemein gebräuchliche Methode, um die Reinheit von Enzympräparaten zu kontrollieren. Die hohe analytische Empfindlichkeit beruht auf der guten Trennleistung für geladene Makromoleküle, deren Wanderungsgeschwindigkeit sowohl von der Nettoladung bei einem bestimmten pH-Wert als auch von der Größe (Siebwirkung des Gels) beeinflußt wird. Der zweifelsfreie Nachweis der elektrophoretischen Reinheit läßt sich allerdings erst nach Anwendung verschiedener Gele erbringen, bei denen pH-Wert und Vernetzungsgrad variiert wurden (RESSLER, 1973; RESSLER und LEE, 1970; CANN und GOAD, 1968).

Die Polyacrylamid-Elektrophorese der normalen Pyrocatechase wurde zum einen durchgeführt, um eine Information über den Reinheitsgrad des Präparates zu erhalten, und zum anderen, um den R_f-Wert zu bestimmen. Durch Vergleich mit demjenigen der Chlorpyrocatechase sollte es möglich sein, die unterschiedlichen Ladungen der beiden Enzyme unter definierten Bedingungen zu quantifizieren.

Zur Präparation der Gele und Durchführung der Elektrophorese siehe Methoden Kap. 13. Auf die Geloberflächen wurden 20 - 100 µl (≙20-100µg Prot.) aufgetragen. Als Markierungsfarbstoff wurde Bromphenolblau zugesetzt. Diese Bande wurde bei der Berechnung der R_f-Werte als Front angenommen. Die Wanderung der normalen Pyrocatechase war wegen ihrer rötlichbraunen Farbe gut zu erkennen. Nachdem die Bande des Bromphenolblaus am unteren Ende des Gels

angekommen war, wurde die Elektrophorese beendet. Die Gele wurden sofort aus den Glasröhrchen entnommen und die braune Bande (normale Pyrocatechase) durch Einstechen eines kleinen, dünnen Drahtstückchens markiert. Ein Teil der Gele wurde mit Amidoschwarz angefärbt. Die anderen Gele wurden in 1 mm dicke Scheibchen zerschnitten und in 1 ml Tris-HCl-Puffer (33,3 mM, pH 8,0; 3,3 mM Mercaptoäthanol) zerdrückt. Nachdem die Gelpartikel abzentrifugiert worden waren, konnte der Überstand auf Enzymaktivität getestet werden.

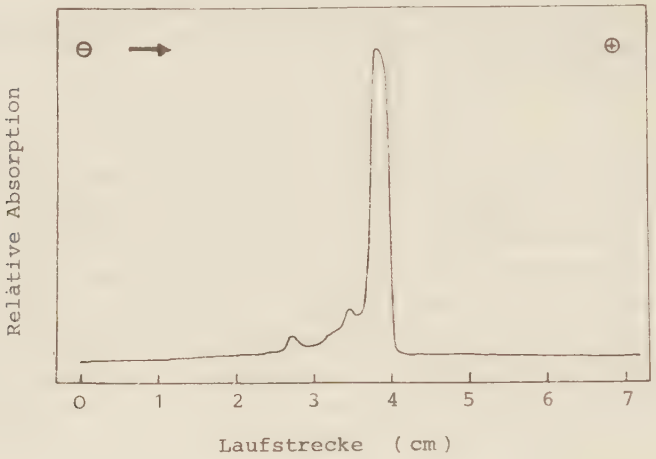


Abb. 12 Densitogramm eines Elektrophorese-Laufes mit hochgereinigter normaler Pyrocatechase

Die Absorption des mit Amidoschwarz angefärbten Proteins wurde bei 609 nm im Durchlichtverfahren gemessen. Auf das ausgewertete Gel waren 70 µg Protein aufgetragen worden.

Für die in Abb. 12 zu erkennende Hauptproteinbande, die "braune" Bande sowie für die Aktivitätsbande wurden die gleichen R_f-Werte von 0,54 gefunden. Damit wurde gezeigt, daß die am stärksten gefärbte Proteinbande der im aktiven Zustand rotgefärbten normalen Pyrocatechase entsprach. In dem Densitogramm (Abb. 12) sind noch

kleinere Proteinpeaks zu erkennen, welche anzeigen, daß das Präparat nicht vollkommen homogen war. Zur Reinheitskontrolle mit Hilfe der Analytischen Ultrazentrifuge siehe Kap. III. 2.2.5.1.

Um für die R_f-Wert-Bestimmung identische Bedingungen zu garantieren, wurden beide Pyrocatechasen in derselben Kammer der Elektrophorese unterzogen. Die Chlorpyrocatechase konnte nicht als rötliche Bande beobachtet werden, da die Konzentration an aktivem Enzym zu niedrig war. Wieder wurde ein Teil der Gele mit Amidoschwarz angefärbt, während der andere Teil der Gele in 1 mm-Scheibchen zerschnitten und auf Chlorpyrocatechaseaktivität getestet wurde.

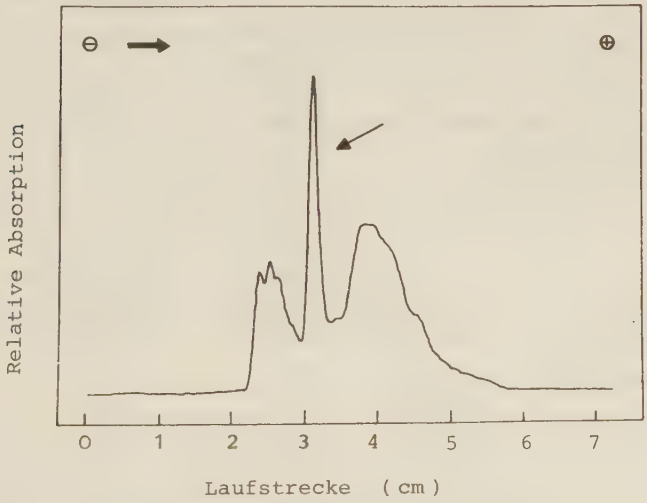


Abb. 13 Densitogramm eines Elektrophorese-Laufes mit gereinigter Chlorpyrocatechase

Die Absorption des mit Amidoschwarz angefärbten Proteins wurde bei 609 nm im Durchlichtverfahren gemessen. Auf das ausgewertete Gel waren 100 µg Protein aufgetragen worden.

Der in Abb. 13 mit einem Pfeil gekennzeichnete Absorptionspeak stimmt mit dem scharfen Aktivitätsmaximum gut überein. Der R_f-Wert betrug 0,436. Das entspricht einer kleineren Wanderungsstrecke als der für die normale Pyrocatechase bestimmten. Setzt man den Siebeffekt für beide Proteine gleich, so ließe sich aus den R_f-Werten eine niedrigere Nettoladung der Chlorpyrocatechase ablesen.

2.2.2. Stabilität der beiden Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 bei verschiedenen Lagerbedingungen

Schon während der Herstellung und Lagerung der Rohextrakte wurde die unterschiedlich schnelle, irreversible Inaktivierung der beiden Pyrocatechasen beobachtet. Der Einfluß von Tris-HCl- und Phosphat-Puffer, Mercaptoäthanol, und Temperatur auf die Stabilität der Enzyme ist in Tab. 5 zusammengefaßt.

Tab. 5 Stabilität der zwei Pyrocatechasen bei verschiedenen Lagerbedingungen

Lagerbedingung		Enzymaktivität nach 24 h in % (0 h ≙ 100%) Chlor-pyrocatechase	Normale Pyrocatechase
Tris-HCl-Puffer pH 8,0 1 mM Mercaptoäthanol	-16 °C	5,4	98
	4 °C	72	100
	20 °C	99	65
Ohne Mercaptoäthanol	-16 °C	25	97
	4 °C	70	97
	20 °C	92	61
Na_2HPO_4/KH_2PO_4-Puffer, pH 8,0	-16 °C	42	94
	4 °C	64	99
	20 °C	90	60

Alle Puffer hatten eine Konzentration von 50 mM. Die Proteinkonzentration während der Lagerung betrug für beide Enzymlösungen 6 mg/ml. Die normale Pyrocatechase entstammte der hochgereinigten Präparation nach dem Sephadex G 200-Lauf, die Chlorpyrocatechase aus einer Präparation nach einmaliger Chromatographie des Rohextrakts an DEAE-Zellulose.

Danach wurde die Chlorpyrocatechase durch Einfrieren am schnellsten inaktiviert. Am deutlichsten war dieser Effekt in Tris-HCl-Puffer in Anwesenheit von Mercaptoäthanol. Zudem stellte sich heraus, daß die Chlorpyrocatechase kältelabil war. Das normale Enzym verlor dagegen in 24 Stunden bei Raumtemperatur 35% seiner Aktivität. Lagerte man es bei 4 °C in Tris-HCl-Puffer mit 1 mM Mercaptoäthanol, so war nach vier Monaten noch kein Aktivitätsverlust festzustellen. Die Chlorpyrocatechase verlor bei Raumtemperatur in Tris-HCl-Puffer in 3 Wochen 10% ihrer Aktivität. Lagerte man ganze Zellen bei -16 °C und 4 °C, so verminderte sich die Aktivität der Chlorpyrocatechase bei beiden Temperaturen in 24 Stunden etwa um 30 - 40%. Die normale Pyrocatechase war unter diesen Bedingungen stabil.

2.2.3. pH-Optima

Als Folge der pH-Abhängigkeit der Proteinkonformation, des Ladungszustandes von essentiellen Aminosäureresten und des Dissoziationsgrades der Substrate zeigen die meisten Enzyme nur in einem engen pH-Bereich maximale Aktivität. Die pH-Optima der zwei Pyrocatechasen wurden in folgenden Puffergemischen gemessen:

pH-Bereich	
4,0 - 5,5	Na-Acetat
5,5 - 8,0	Na_2HPO_4/KH_2PO_4
7,5 - 9,1	Tris-HCl
9,1 - 11,0	Ammoniak/Ammoniumchlorid

Die Konzentrationen betrugen jeweils 50 mM. An den Grenzen zweier sich ergänzender Puffersysteme wurden die Enzymaktivitäten bei jeweils gleichem pH-Wert in beiden Puffergemischen gemessen. Damit sollten pufferspezifische Einflüsse bemerkt werden.

Wie aus Abb. 14 hervorgeht, setzten beide Pyrocatechasen ihr Substrat Brenzcatechin bei pH 8,0 am schnellsten um. Brenzcatechin wird bei alkalischen pH-Werten schnell zu ortho-Chinon oxidiert (RÖMPP, 1962, S. 870). Dieses Umwandlungsprodukt ist ein sehr potenter Inhibitor für Pyrocatechasen (KOJIMA et al., 1967; HAYAISHI et al., 1957; VARGA und NEUJAHR, 1970). Außerdem

polymerisiert das sehr reaktive ortho-Chinon unter Beteiligung radikalischer Zwischenstufen, welche die Pyrocatechasen auch unspezifisch hemmen können.

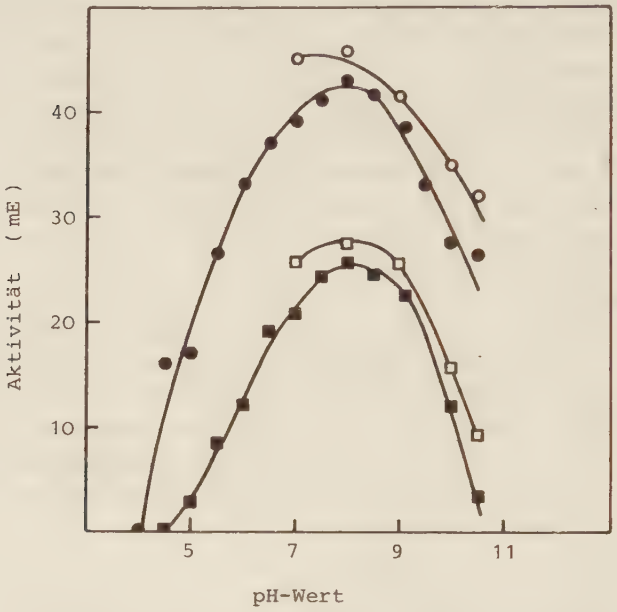


Abb. 14 Abhängigkeit der Enzymaktivität der Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 vom pH-Wert

Die Testansätze enthielten im Falle der normalen Pyrocatechase 20 µl Enzymlösung (≙ 13,4 µg Protein) und bei den Tests der Chlorpyrocatechase 50 µl Enzymlösung (≙ 41 µg Protein). Die Reaktionen wurden mit 100 µl Brenzcatechinlösung (≙ 1 µmol) gestartet. Weitere Erklärungen zur Versuchsdurchführung siehe Text.

o——o Normale Pyrocatechase mit 3,3 mM Mercaptoäthanol

●——● Normale Pyrocatechase

□——□ Chlorpyrocatechase mit 3,3 mM Mercaptoäthanol

■——■ Chlorpyrocatechase

Die Umwandlung in das rotgefärbte ortho-Chinon läßt sich durch Mercaptoäthanol stark verlangsamen. Um zu sehen, ob der Aktivitätsabfall im oberen pH-Bereich auf der Inhibition durch das ortho-Chinon beruhte, mußte die Aktivitätsbestimmung oberhalb pH 8,0 mit und ohne Mercaptoäthanol durchgeführt werden. Abb. 14 zeigt, daß abgesehen von der generellen Aktivitätssteigerung durch Mercaptoäthanol (s. Kap. III. 2.2.4.) der pH-bedingte Abfall nicht verhindert wurde. HAYAISHI et al. (1957) beobachteten in Anwesenheit von Mercaptoäthanol mit der Pyrocatechase aus Pseudomonas fluorescens auch oberhalb von pH 8,0 eine konstante Aktivität, während sie ohne das SH-Reagenz schnell abfiel.

Im folgenden Versuch wurde die Stabilität der beiden Pyrocatechasen bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Dazu wurden die beiden Enzyme bei unterschiedlichen pH-Werten fünf Minuten lang inkubiert und anschließend ihre Aktivitäten bei pH 8,0 gemessen. Aus Abb. 15 geht hervor, daß die normale Pyrocatechase bei $pH \geq 6,0$ stabil war. Unterhalb pH 5,7 wurde das Enzym schnell irreversibel desaktiviert. Die Chlorpyrocatechase war erst bei $pH \geq 7,5$ stabil und wurde mit abfallendem pH-Wert langsam desaktiviert. Das bedeutet, daß der Abfall der Chlorpyrocatechaseaktivität unterhalb des pH-Optimums von pH 8,0 im wesentlichen durch eine irreversible Inaktivierung bedingt ist. Eine fünfminütige Inkubation zwischen pH 8,0 und 10,5 schädigte beide Enzyme nicht.

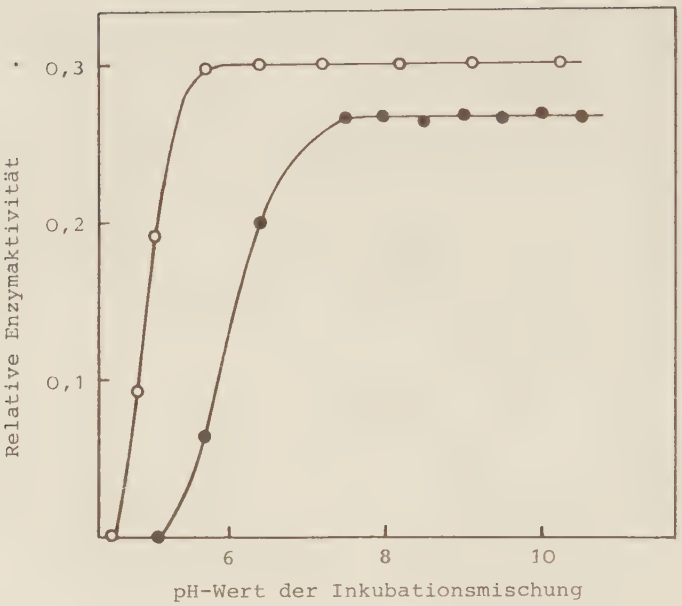


Abb. 15 Einfluß des pH-Wertes auf die Stabilität der beiden Pyrocatechasen aus Pseudomonas Stamm B.13

Jeweils 50 µl Chlorpyrocatechaselösung (≙ 50 µg Protein) bzw. 30 µl einer Lösung der normalen Pyrocatechase (≙ 15 µg Protein) wurden in 0,3 ml Tris-Acetat-Puffer (50 mM, 3,3 mM Mercaptoäthanol) bei unterschiedlichen pH-Werten 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Enzymaktivitäten im gleichen Puffer bei pH 8,0 gemessen.

o——o Normale Pyrocatechase

●——● Chlorpyrocatechase

2.2.4. Einfluß von Schwermetallionen und SH-Reagenzien auf die Aktivität der beiden Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13

Alle bisher untersuchten Brenzcatechin-1,2-Dioxygenasen enthalten Nicht-Häm-Eisen als prosthetische Gruppe, wobei Eisen in der Oxidationsstufe Fe(III) auftritt (NOZAKI, 1974). NAGAMI und SENOH (1974) wiesen im aktiven Zentrum des Enzyms aus Brevibacterium fuscum p-13 die Aminosäurereste von Tryptophan und Cystein nach. Die Autoren postulieren die Bindung des Eisens an die SH-Gruppe des Cysteins. Soweit bisher bekannt ist, sind alle Pyrocatechasen mehr oder weniger stark durch Schwermetallionen hemmbar. Für den weiteren Vergleich der beiden 1,2-Dioxygenasen aus Ps. Stamm B.13 untereinander sowie mit den Daten aus der Literatur wurde die Hemmbarkeit auch für diese beiden Enzyme getestet. Die in Tabelle 6 zusammengestellten Daten lassen sich wie folgt zusammenfassen. Quecksilber-(II)-ionen hemmten die Chlorpyrocatechase weniger als die normale. Nach 0 und nach einer Stunde Vorinkubation mit Cu^{2+}-Ionen wurde die Chlorpyrocatechase stärker gehemmt als das gewöhnliche Enzym; jene wurde nach 24 Stunden wenig mehr gehemmt als nach einer Stunde. Dagegen fand man nach 24 Stunden nur noch 8,5% der normalen Pyrocatechaseaktivität wieder. Ganz analog unterschieden sich die beiden Enzyme bei der Hemmung durch das SH-Gift p-Chlormercuribenzoat.

Die Hemmung durch Schwermetallionen ließ sich nach 0 und einer Stunde Vorinkubation bei der normalen Pyrocatechase mit 1 mM Mercaptoäthanol im Testansatz effektiver wieder aufheben als bei der Chlorpyrocatechase. Bei beiden Enzymen war reduziertes Glutathion (10^{-4} M) weniger wirksam. Während sich die Hemmung nach 20 Stunden Inkubation bei der normalen Pyrocatechase mit Mercaptoäthanol erheblich verringern ließ, wurde die Inhibition der Chlorpyrocatechase durch diese Behandlung deutlich verstärkt.

1mM Mercaptoäthanol steigerte bei der Abwesenheit von Hemmstoffen die Aktivität der Chlorpyrocatechase auf 109% und die der normalen auf 105% verglichen mit der Aktivität ohne Zusätze. Reduziertes Glutathion (1 mM) bewirkte keine Aktivitätserhöhung.

Tab. 6 Hemmung der Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 durch "SH-Gifte"

Hemmstoff	Chlorpyrocatechase						Normale Pyrocatechase					
	Ohne Inkubation		1 Std. Inkubation		20 Std. Inkubation		Ohne Inkubation		1 Std. Inkubation		20 Std. Inkubation	
	-	* 1 mM Mercap.-äthanol	-	1 mM Mercap.-äthanol	-	1 mM Mercap.-äthanol	-	1 mM Mercap.-äthanol	-	1 mM Mercap.-äthanol	-	1 mM Mercap.-äthanol
Ohne	100	109	100	109	100	109	100	105	100	105	100	105
10^{-4} M $HgCl_2$	69,8	86,3	60,0	66,3	60,0	25,7	23,2	99,0	21,1	56,7	19,5	51,2
10^{-4} M $CuSO_4$	34,1	92,3	31,6	40,7	25,7	4,9	96,6	96,6	86,0	86,0	8,5	34,1
10^{-5} M p-CMB	68,5	106	34,8	67,0	34,2	11,7	87,9	103	11,6	84,0	11,0	69,5

*
1 mM Mercaptoäthanol wurde nur den Testansätzen zur Aktivitätsbestimmung zugesetzt.
Alle Aktivitäten sind in % angegeben, jeweils bezogen auf den Ansatz ohne Zusätze ≙ 100%.
Die Mischungen wurden bei 4°C inkubiert. Die Inkubationsansätze enthielten in 2,5 ml 50 µl normale Pyrocatechase (≙ 2,4 µg Protein) bzw. 50 µl Chlorpyrocatechaselösung (≙ 42 µg Protein), 100 mole Tris-HCl-Puffer (pH = 8,0) und Hemmstoff. Das Testvolumen betrug 3 ml. Die Reaktionen wurden mit 100 µl Brenzcatechinlösung (≙ 1 µmol) gestartet.

2.2.5. Molekulargewichtsbestimmung der Pyrocatechasen

Zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen bieten sich verschiedene physikalische Methoden an. Für die Untersuchung der normalen Pyrocatechase wurden die folgenden vier Techniken angewendet:

1. Analytische Ultrazentrifugation mit Bestimmung der Svedberg-Konstanten,
2. Sephadex G 200-Gelfiltration,
3. Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation und
4. Porengrößengradienten-Gelelektrophorese.

Das Molekulargewicht der Chlorpyrocatechase wurde nur mit Hilfe der Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation bestimmt. Bei den Methoden 2., 3. und 4. wird das Verhalten des Probeenzyms mit demjenigen von Referenzproteinen verglichen, deren Molekulargewichte bekannt sind.

2.2.5.1. Analytische Ultrazentrifugation

Mit Hilfe dieser Technik können Molekulargewichte direkt ohne authentische Referenzproteine bestimmt werden. Der hohe Reinheitsgrad der normalen Pyrocatechase, welcher Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Methode ist, wurde mit Hilfe der Gel-Elektrophorese sichergestellt (s. Kap. III. 2.2.1.). Ein Proteinpräparat, welches noch viel Fremdprotein enthält, gibt sich bei der Gleichgewichts-Sedimentation dadurch zu erkennen, daß die Auftragung von log c (c = Proteinkonzentration) gegen r^2 (r = Abstand von der Rotorachse) keiner Geraden sondern einer Exponentialkurve entspricht (YPHANTIS, 1964). Obwohl das Präparat der normalen Pyrocatechase elektrophoretisch nicht völlig rein war (s. Kap. III. 2.2.1.) zeigte die genannte Auftragung (Abb. 16) einen linearen Verlauf. Die Molekulargewichtsbestimmung wurde mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (A_{280} = 0,32 - 1,38) durchgeführt. Nach SCHACHMAN (1959, S. 236 - 247) ist der Sedimentationskoeffizient abhängig von der Proteinkonzentration der Probe. Dies beschreibt die folgende

Gleichung:

$$s = s_o (1 - k c) \qquad (1)$$

Dabei bedeuten s = Sedimentationskoeffizient bei der Konzentration c, s_o = derjenige bei der Konzentration O, c = Proteinkonzentration und k = Konstante.

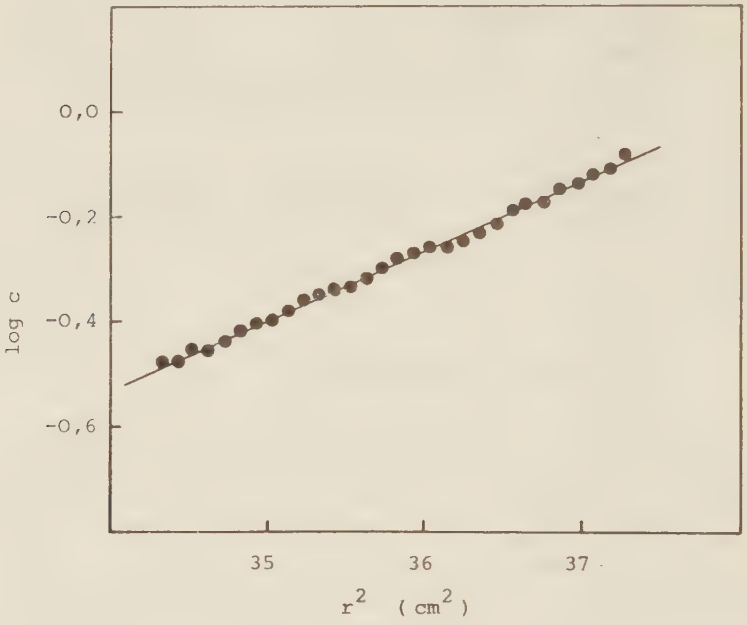


Abb. 16 Gleichgewichts-Sedimentation der normalen Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13 in der analytischen Ultrazentrifuge

Die Bestimmungen wurden bei 9 000 U/min und 5 °C durchgeführt. Die Wanderung des Proteins wurde mit einem photoelektrischen Scanner verfolgt. Die Auftragung entstammt einem Lauf mit der Proteinkonzentration c = 0,538 ($c = A_{280}$). Weitere Versuchsbedingungen sind in Methoden Kap. 12.1 beschrieben.

c = Proteinkonzentration (A_{280nm})

r = Abstand von der Rotorachse

Aus der Steigung der Geraden (Abb. 16) wurde nach folgender Gleichung das Molekulargewicht bestimmt (SCHACHMAN, 1959):

$$M_{app.} = \frac{R \cdot T}{(1 - \bar{V} \cdot \rho) \cdot \omega^2} \cdot \frac{2{,}303 \cdot d \log c}{\frac{1}{2} \cdot d\,(x^2)} \qquad (2)$$

Dabei bedeuten $M_{app.}$ = Molekulargewicht unter Meßbedingungen, R = Allgemeine Gaskonstante = $8{,}3149 \cdot 10^7$ erg/Mol Grad, T = Absolute Temperatur (K), $\bar{V}$ = partialspezifisches Volumen des Proteins = 0,749 ml/g, ρ = spezifische Dichte der Lösung = 1 g/ml, ω = Winkelgeschwindigkeit des Rotors in rad/sec = Upm$\cdot \frac{2\pi}{60}$, c = Proteinkonzentration ($A_{280\ nm}$) und x = Abstand des Proteins von der Rotorachse.

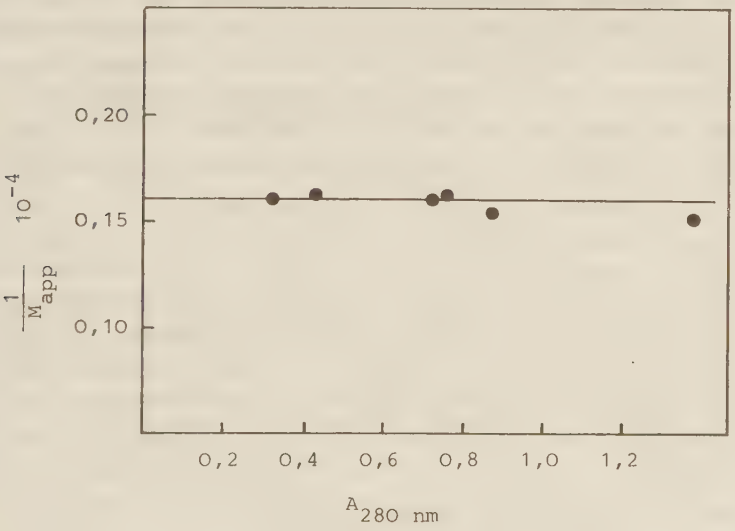


Abb. 17 Bestimmung des Molekulargewichts für die Proteinkonzentration c = 0

$M_{app.}$ = Molekulargewicht unter Meßbedingungen, c = Proteinkonzentration der Probe ($A_{280\ nm}$). Weitere Erklärungen zu der Bestimmung siehe Text.

Zur Berechnung des Molekulargewichts für die Konzentration c = 0 wurde $\frac{1}{M_{app.}}$ der verschiedenen Bestimmungen gegen c aufgetragen (Abb. 17). Die Gerade wurde nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt und eingezeichnet. Sie gehorcht der Funktion

$$\frac{1}{M_{app.}} = m \cdot c + b \ ;$$

Dabei ist $m = 2{,}2 \cdot 10^{-7}$ und $b = 0{,}1610 \cdot 10^{-4}$. Für c = 0 ist $b = \frac{1}{M_{c=0}} = 0{,}1610 \cdot 10^{-4}$. Daraus errechnet sich für das Molekulargewicht der normalen Pyrocatechase der Wert $M_{c=0} = 62\,112$, wobei die Streuung der Meßwerte berücksichtigt ist.

Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe der Gleichgewichtszentrifugation bei niederen Umdrehungszahlen ermittelt. Für die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten wurde die Sedimentationsgeschwindigkeit bei hohen g-Zahlen (48 000 U/min) gemessen. Dabei wurde im Abstand von vier Minuten die Wanderungsstrecke der "boundary" bestimmt und mit der Zeit in Beziehung gesetzt. Mit Gleichung (3) wurde die Sedimentationskonstante $s_{app.}$ berechnet.

$$s_{app.} = \frac{d \ln x}{dt \cdot \omega^2} \qquad (3)$$

Dabei bedeuten $s_{app.}$ = Sedimentationskoeffizient unter Meßbedingungen, x = Abstand der "boundary" von der Rotorachse, t = Zeit in min und ω = Winkelgeschwindigkeit in $\frac{Upm \cdot 2\pi}{60}$ (sec^{-1}). Die Werte füe $s_{app.}$ wurden für den Zeitpunkt t = 0 extrapoliert. Mit Hilfe von Gleichung (4) wurden die Werte auf Standardbedingungen korrigiert.

$$s_{20,w} = s_{app.} \cdot \left(\frac{\eta_t}{\eta_{20}}\right) \cdot \left(\frac{\eta}{\eta_o}\right) \cdot \frac{1 - \bar{V} \cdot \rho_{20,w}}{1 - \bar{V} \cdot \rho_t} \qquad (4)$$

Dabei bedeuten η_t und η_{20} die Viskosität des Wassers bei t °C und 20 °C, η und η_o die Viskosität des Lösungsmittels und die des Wassers, $\bar{V}$ das partial-spezifische Volumen, $\rho_{20,w}$ und ρ_t die spezifische Dichte von Wasser bei 20 °C und die des Lösungsmittels bei 20 °C. $s_{20,w}$ gibt den Wert an, der bei 20 °C in Wasser

gemessen würde. Aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten wurde für zwei Proteinkonzentrationen folgende Sedimentationskonstante ermittelt:

$$s_{20,w} = 4{,}00\ S$$

KOJIMA et al. (1967) bestimmten mit der analytischen Ultrazentrifuge für die Pyrocatechase aus Pseudomonas arvilla C-1 einen $s_{20,w}$-Wert von 4,31 S bei einem Molekulargewicht von 85 000 Dalton. NAKAGAWA et al. (1963) berichten für das Enzym aus Brevibacterium fuscum die Werte $s_{20,w}$ = 4,36 S und MG = 78 000. Für die Pyrocatechase aus Pseudomonas fluorescens ermittelten HAYAISHI et al. (1957) in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,5 bei c = 0,2% einen Sedimentationskoeffizienten von s = 3,92 S und einen Wert für das Molekulargewicht von 82 900 Dalton. Im Vergleich mit den Literaturdaten sind die Werte füe die normale Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13 kleiner.

2.2.5.2. Sephadex G 200-Gelfiltration

Bei dieser Methode wird die Wanderungsgeschwindigkeit des Enzyms im Sephadex-Gel zum Molekulargewicht in Beziehung gesetzt. Durch Vergleich mit bekannten Proteinen wird das Molekulargewicht berechnet (ACKERS, 1964; OEDING, 1972; ANDREWS, 1964). Die auf eine Sephadex G 200-Säule aufgetragene Probe (2 ml) enthielt 1 ml 29-fach angereicherte normale Pyrocatechase (= 6 mg Protein), 6 mg Ferritin (MG = 540 000), 5 mg Katalase (MG = 240 000), 5 mg Aldolase (MG = 158 000), 15 mg Chymotrypsinogen A (MG = 25 000) und 6 mg Cytochrom c (MG = 13 500). Die beiden sichtbaren Referenzproteine Ferritin (gelb) und Cytochrom c (rot) gaben den Bereich an, der fraktionsweise gesammelt wurde.

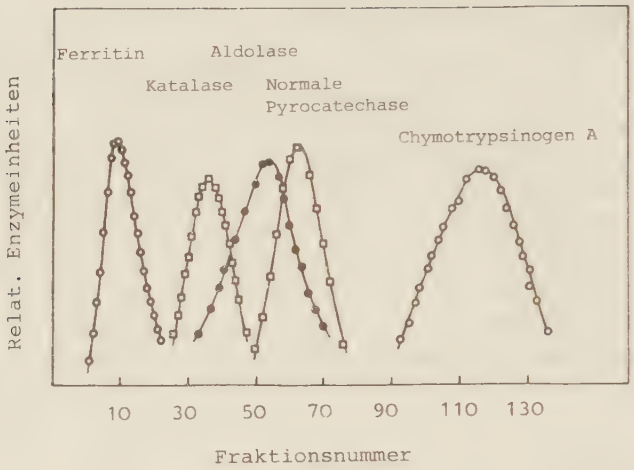


Abb. 18 Elutionsdiagramm eines Gemisches aus Vergleichsproteinen und der normalen Pyrocatechase zur Molekulargewichtsbestimmung auf Sephadex G 200 fine

Zu den Versuchsbedingungen siehe Methoden Kap. 12.3.. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 25.7 ml/Std., das Fraktionsvolumen 1,44 ml und der Arbeitsdruck 15 cm Wassersäule.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der normale Pyrocatechase wurden die Elutionsvolumina (Fraktionsnummern) der Referenzproteine gegen die Logarithmen der Molekulargewichte von den Vergleichsproteinen aufgetragen (Abb. 19). Mit Ausnahme von Cytochrom c , das ein zu geringes Molekulargewicht vortäuschte, lagen die Werte aller Referenzproteine auf einer Geraden. Für das basische Protein Cytochrom c nimmt man Wechselwirkungen mit dem Gelmaterial an, welche zu einer erhöhten Retentionszeit führen (OEDING, 1972).

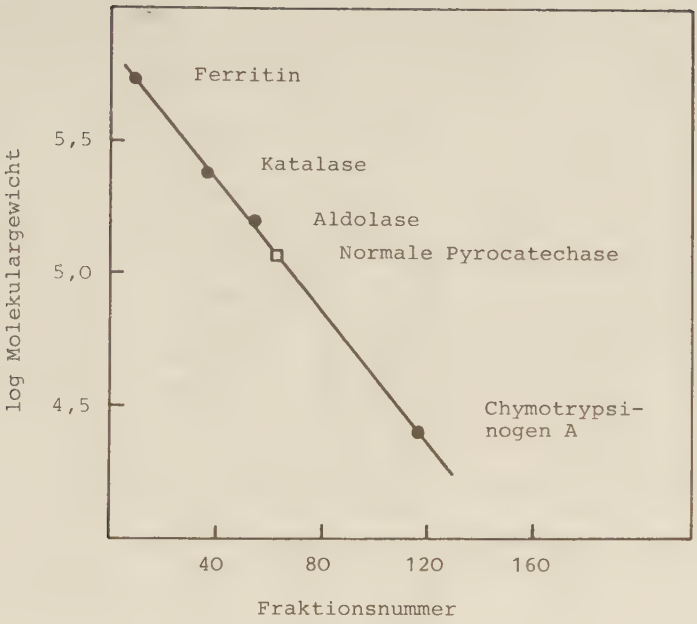


Abb. 19 Molekulargewichtsbestimmung der normalen Pyrocatechase durch Gelfiltration an Sephadex G 200 fine

Die Nummern der Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten bzw. mit der stärksten Absorption wurden aus Abb. 18 abgelesen und gegen den Logarithmus der Molekulargewichte aufgetragen.

Aus Abb. 19 wurde für die normale Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13 ein Molekulargewicht von 117 500 Dalton ermittelt.

2.2.5.3. Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation

Die reproduzierbaren Ergebnisse der ersten beiden Molekulargewichtsbestimmungen wichen stark voneinander ab, was eine Kontrollbestimmung nach einer dritten Methode notwendig machte.

Die Gradientenzentrifugation hat den Vorteil, daß für ihre Anwendbarkeit keine hochgereinigten Präparate notwendig sind. Somit konnte auch das Molekulargewicht der Chlorpyrocatechase bestimmt werden und mit dem der normalen Pyrocatechase verglichen werden.

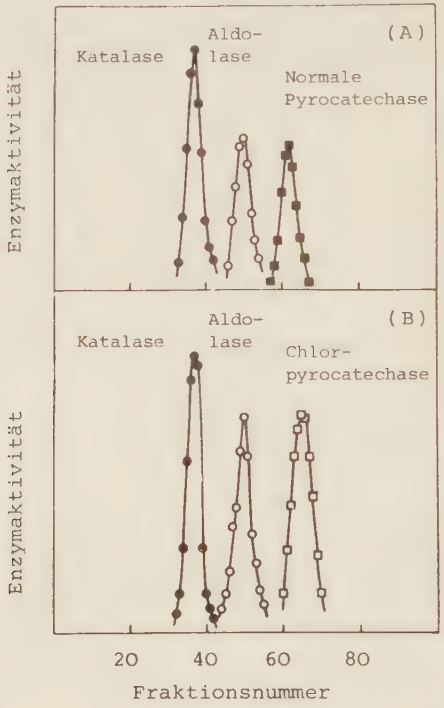


Abb. 20 Sedimentation der normalen Pyrocatechase (A) bzw. Chlorpyrocatechase (B) und der Referenzproteine Katalase und Aldolase im linearen Saccharosegradienten

13,5 ml eines linearen Saccharosegradienten (7 - 30% w/w in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0; 1 mM Mercaptoäthanol) wurden mit 0,2 ml des jeweiligen Enzymgemisches überschichtet und 17 Std. bei 39 000 U/min zentrifugiert. Der Gradient wurde durch Anstechen des Zentrifugenröhrchens in 6 Tropfen-Fraktionen entnommen.

Die Experimente wurden in Anlehnung an MARTIN und AMES (1961) und OEDING (1972) durchgeführt. Die Bestimmung für die normale Pyrocatechase wurde bei 5 und 15 °C durchgeführt, ohne jedoch verschiedene Ergebnisse zu erbringen. Die Zentrifugation der Chlorpyrocatechase wurde wegen der Kältelabilität nur bei 15 °C durchgeführt. Als Referenzprotein diente Katalase mit bekannten Werten für $s_{20,w}$ (= 11,3 S) und das Molekulargewicht (= 240 000 Dalton). Zur Überprüfung der Methodik wurden die Konstanten des zweiten Referenzproteins Aldolase (MG = 158 000) mitbestimmt. Aus Abb. 20 wurden die Daten zur Molekulargewichtsbestimmung entnommen. Die Wanderungsstrecke wurde als Quotient aus der Fraktions-Nr. mit der höchsten Enzymaktivität und der Gesamtzahl der Fraktionen ausgedrückt. Daraus wurde der Wert R und der Sedimentationskoeffizient ($s_{20,w}$) nach folgender Gleichung berechnet (MARTIN und AMES, 1961):

$$R = \frac{\text{Wanderungsstrecke des Standards}}{\text{Wanderungsstrecke der Probe}} = \frac{s_{20,w,\text{Standard}}}{s_{20,w,\text{Probe}}}$$

Aus dem Verhältnis der Sedimentationskoeffizienten wurden mit Hilfe der nachfolgenden Beziehung die Molekulargewichte ermittelt:

$$\frac{s_1}{s_2} = \left(\frac{MG_1}{MG_2} \right)^{2/3}$$

Das für das Referenzprotein Aldolase bestimmte Molekulargewicht (s. Tab. 7) liegt um 20 000 unter dem von BOEHRINGER (Boehringer Combithek) angegebenen Wert von 158 000. Die maximale Abweichung der Messung betrug 3%. Eine unexakte Bestimmung würde Abweichungen nach beiden Seiten des korrekten Wertes zeitigen. Der stets zu niedrig ausfallende Wert deutet auf einen methodischen Fehler hin. Bestimmte man das Molekulargewicht für die Aldolase mit Hilfe der Sephadex G 200-Gelfiltration, so erhielt man den Wert 148 000.

Tab. 7 Wanderungsquotienten und daraus berechnete Sedimentationskoeffizienten und Molekulargewichte von Referenz- und Testproteinen

	R	$s_{20,w}$ (S)	Mol.-Gew.
Referenzproteine			
Katalase	1,0	11,3	240 000
Aldolase	1,44	7,86	139 000
Testproteine			
Normale Pyrocatechase	2,36	4,78	66 000
Chlorpyrocatechase	2,77	4,08	52 000

2.2.5.4. Porengrößengradienten-Gelelektrophorese

Bei der Porengrößengradienten-Gelelektrophorese wandern die geladenen Moleküle in Richtung immer kleiner werdender Gelporen bis zu ihrer Ausschlußgrenze. Die Gele wurden mit Hilfe eines linearen Konzentrationsgradienten an Acrylamid hergestellt (MARGOLIS und KENRICK, 1968). In Kontrollversuchen wurde für alle verwendeten Proteine die notwendige Elektrophoresedauer bestimmt. Eine scharfe Bandengrenze auf der dem Gelende zugewandten Seite ist ein wichtiges Indiz dafür, daß die Ausschlußgrenze erreicht ist. Entscheidend für die Wanderungsstrecke ist infolgedessen nur die Molekülgröße.

Als Eichprotein diente Rinderserumalbumin (Boehringer Combithek) mit einem Molekulargewicht von 67 000. Während der Elektrophorese bilden sich Di-, Tri-, Tetra- und Polymere dieses Proteins. Die Banden der Oligomeren waren bis zum Tetrameren gut unterscheidbar und ließen sich zur Aufstellung einer Eichkurve heran-

ziehen.

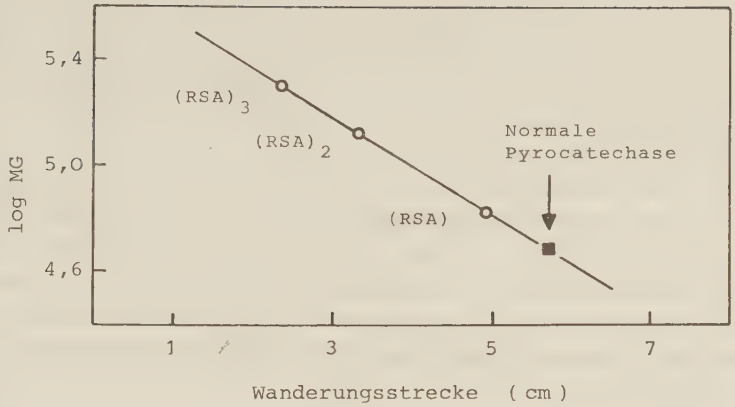


Abb. 21 Porengrößengradienten-Gelelektrophorese der normalen Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13 mit Rinderserumalbumin und dessen Oligomeren als Referenzproteinen

Die Wanderungsstrecke der Proteine in cm wurde gegen die Logarithmen der Molekulargewichte aufgetragen. Im dargestellten Lauf war eine 50 µl-Probe (= 25 µg normale Pyrocatechase, 50 µg RSA), die mit 7% Saccharose beschwert worden war, aufgetragen worden. Die Elektrophorese wurde nach 24 Stunden beendet. Weitere Details zur Durchführung sind in Methoden Kap. 12. 4. beschrieben.

Schon nach 2 von 24 Stunden Elektrophoresedauer war die braune Bande der normalen Pyrocatechase gut zu erkennen. Nach Versuchsende wurden die Glasröhrchen zerschlagen, da die Gele nach der Polymerisation noch nachquellen und daher schwer aus den Röhrchen zu entnehmen sind. Bei allen Gelen wurde die braune Bande durch Einstechen eines dünnen Drahtstückes gekennzeichnet. Ein Teil der Gele wurde sofort in Coomassie-Brilliant Blue R 250-Lösung gefärbt. Die restlichen Gele wurden in 1 mm dicke Scheibchen zerschnitten, in 1 ml Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0; 1 mM Mercaptoäthanol) mit einem Glasstab zerdrückt und auf Pyrocate-

chaseaktivität getestet. Nur die braune Bande enthielt die Aktivität. Die gefärbten Gele wurden in 5%-iger Essigsäure entwickelt. Dann wurde die Bandenlage ausgemessen. Abb. 21 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Elektrophoreselaufs. Aus insgesamt 10 Bestimmungen wurde für die normale Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13 ein Molekulargewicht von 48 000 Dalton ermittelt. Die maximale Abweichung betrug 4%.

2.2.5.5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen

Die nach den verschiedenen Methoden erhaltenen Ergebnisse sollen unter Abschätzung eventuell auftretender Fehler oder Störungen kritisch gegenübergestellt werden.

Tab. 8 Zusammenstellung der mit verschiedenen Methoden ermittelten Molekulargewichte und Sedimentationskoeffizienten

Methode	Normale Pyrocatechase		Chlorpyrocatechase	
	Mol.-Gew. (Dalton)	$s_{20,w}$ (S)	Mol.-Gew. (Dalton)	$s_{20,w}$ (S)
Analytische Ultrazentrifuge	62000	4,00	-	-
G 200-Gelfiltration	117500	-	-	-
Saccharose-Dichtegradient	66000	4,78	52000	4,08
Gradientengel-Elektrophorese	48000	-	-	-

Die Sephadex-Gelfiltration beruht auf der Gleichgewichtsverteilung einer Substanz zwischen der Phase innerhalb der porösen Gelpartikel ("penetrable volumes") und der mobilen äußeren Phase (PORATH, 1963; LAURENT und KILLANDER, 1964; SQUIRE, 1964). Das Verhalten einer definierten Substanz bei der Gelfiltration und daraus folgend das Elutionsvolumen sind eine Funktion der Molekülform, ausgedrückt durch den Stokeschen Radius (SIEGEL und MONTY, 1966). Es ist leicht verständlich, daß zwei Moleküle mit gleichem Molekulargewicht, aber sehr verschiedener Form unterschiedlich leicht in die Partikelporen hineindiffundieren. Aus den für diesen Zusammenhang formulierten Gleichungen (LAURENT und KILLANDER, 1964; SQUIRE, 1964; PORATH, 1963) geht hervor, daß das Elutionsvolumen mit steigendem Stokeschen Radius abnimmt. Nach SCHACHMAN (1959) ist der Sedimentationskoeffizient s dem Stokeschen Radius umgekehrt proportional. PEACOCKE und SCHACHMAN (1954) wiesen nach, daß der Wert des Sedimentationskoeffizienten für ein Rotationsellipsoid mit steigendem Achsenverhältnis absinkt.

Berücksichtigt man diese Abhängigkeiten bei der Beurteilung der Molekulargewichte (s. Tab. 8), so läßt sich für die normale Pyrocatechase eine fibrilläre Form ableiten. Diese würde bei der Sephadex-Gelfiltration ein zu hohes und andererseits bei der Gleichgewichts- und Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation ein zu niedriges Molekulargewicht vortäuschen. Die von der Kugel stark abweichenden Molekülformen von Fibrinogen (SIEGEL und MONTY, 1966) und Acetacetyl-CoA-Reduktase (OEDING, 1972) führten bei den Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der Gelfiltration ebenfalls zu falschen Ergebnissen, wenn die Molekulargewichte direkt mit den Elutionsvolumina in Beziehung gesetzt wurden. Als Eichsubstanzen dienten sphärische Proteine wie Ferritin und Rinderserumalbumin.

In der Porengrößengradienten-Gelelektrophorese wird ein Protein von der Form eines Rotationsellipsoids mit hohem Achsenverhältnis weiter wandern als ein Molekül mit Kugelform und gleichem Molekulargewicht. Dabei ist gleiches partial-spezifisches Volumen

vorausgesetzt. Als Referenzprotein wurde Rinderserumalbumin eingesetzt, welches ein Achsenverhältnis von etwa 6 : 1 besitzt (SCHACHMAN, 1959; SIEGEL und MONTY, 1966). Bei dieser Methode ist die Ausschlußgrenze demnach dann erreicht, wenn der kleinere Durchmesser des Ellipsoids größer ist als der Durchmesser der Poren. Ein extrem geformtes Molekül wird also ein zu kleines Molekulargewicht vortäuschen. Tatsächlich wurde für die normale Pyrocatechase mit der zuletzt erwähnten Technik das niedrigste Molekulargewicht (48 000 Dalton) ermittelt.

Wenn die normale Pyrocatechase eine fibrilläre Form besäße, so müßte auf Grund der oben dargestellten Zusammenhänge für das Enzym ein Molekulargewicht zwischen 80 000 und 90 000 Dalton angenommen werden. Eine endgültige Aussage ist erst nach der Bestimmung des Stokeschen Radius möglich, aus dem das Molekulargewicht berechnet werden kann (OEDING, 1972).

2.2.6. Meta-Spaltung von 3-Methylbrenzcatechin durch die normale ortho-Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13

Substituierte Brenzcatechine können auf drei verschiedene Arten der Ringöffnung unterliegen (s. Abb. 22). Bisher glaubte man, daß die Ringspaltungsenzyme streng reaktionsspezifisch seien, das heißt, daß die entsprechenden Enzyme nur eine Art der Ringöffnung durchführen können. FUJIWARA et al. (1975) wiesen zweifelsfrei nach, daß die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase aus Pseudomonas arvilla C-1 3-Methyl- und 3-Methoxybrenzcatechin sowohl zwischen den C-Atomen 1 und 2 (intradiol) als auch zwischen 2 und 3 (extradiol, proximal) spalten kann.

Die meta-Spaltung von 3-Methylbrenzcatechin wurde auch für die normale Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13 beobachtet, nicht aber für die Chlorpyrocatechase. FUJIWARA et al. (1975) konnten auch für die Pyrocatechase aus Brevibacterium fuscum , deren kinetische Daten (V_{max},K_m) für substituierte Brenzcatechine denjenigen der Chlorpyrocatechase sehr ähnlich sind (NAKAGAWA et al., 1963), keine meta-Spaltungsaktivität nachweisen.

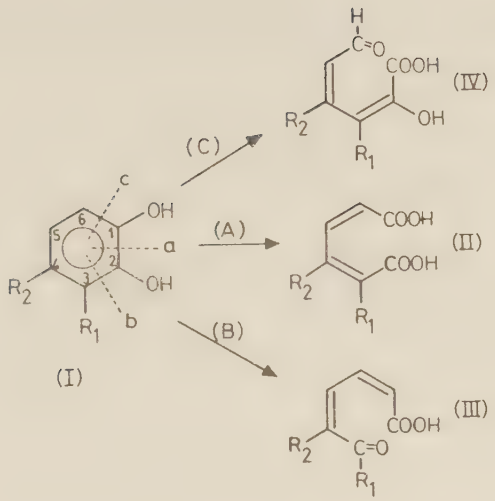


Abb. 22 Mögliche Arten der Ringspaltung von substituierten Brenzcatechinen

a = Intradiol- oder ortho-Spaltung durch (A) = 1,2-Dioxygenase (Pyrocatechase)

b = Extradiol- oder meta-Spaltung, proximal durch (B) = 2,3-Dioxygenase (Metapyrocatechase)

c = Extradiol- oder meta-Spaltung, distal durch (C) = 1,6-Dioxygenase (Metapyrocatechase)

Das Produkt der meta-Spaltung α-Hydroxy-ε-methyl-muconsäuresemialdehyd ist gelb gefärbt. Die Substanz besitzt in 50 mM Tris-Acetat-Puffer, pH 7,5 bei λ_{max} = 390 nm einen molaren Extinktionskoeffizienten von ε = 18 000 (FUJIWARA et al., 1975). Somit konnten die Aktivitäten der meta-Spaltung (λ_{max} = 390 nm) und ortho-Spaltung (λ_{max} = 260 nm, ε = 18 000) getrennt photometrisch

bestimmt werden. Das Verhältnis von Intradiol- zu Extradiol-Spaltung betrug 14 : 1. FUJIWARA et al. (1975) fanden für das Enzym aus Pseudomonas arvilla C-1 16 : 1.

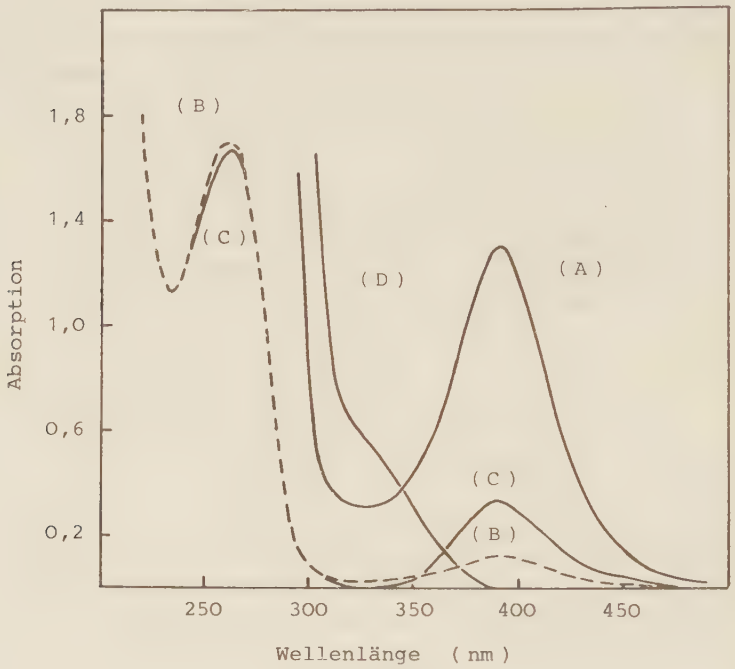


Abb. 23 Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte aus dem Umsatz von 3-Methylbrenzcatechin durch die normale Pyrocatechase

Die Reaktionsmischung enthielt in 3 ml Volumen 300 µg normale Pyrocatechase (29-fach angereichert), 3,0 µmole 3-Methylbrenzcatechin und 150 µmole Tris-Acetat, pH 7,5. Die Referenzküvette enthielt die gleichen Komponenten außer 3-Methylbrenzcatechin. A = Spektrum der Reaktionsmischung unverdünnt, B = 1 : 10 verdünnte Reaktionsmischung, C = 1 : 10 verdünnte Reaktionsmischung bei pH 12,4, D = unverdünnte Reaktionsmischung bei pH 1,5.

Kurve B in Abb. 23 zeigt bei 260 nm das Absorptionsmaximum der α-Methylmuconsäure und bei 390 nm das Maximum des α-Hydroxy-ε-methylmuconsäuresemialdehyds. Erhöhte man den pH-Wert der 1 : 10 verdünnten Reaktionsmischung auf 12,4, so stieg die Absorption bei 390 nm auf das 2,5-fache des Wertes bei pH 7,5 (Kurve C). Säuerte man die Reaktionsmischung (Spektrum A) auf pH 1,5 an, so verschwand das Absorptionsmaximum bei 390 nm, wie Spektrum D zeigt. Diese Beobachtungen deckten sich widerspruchsfrei mit den Untersuchungen von FUJIWARA et al. (1975), woraus geschlossen wurde, daß auch die normale Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13 meta-Spaltungsaktivität besitzt.

Beim Umsatz von Brenzcatechin und 4-Methylbrenzcatechin war keine Absorptionsänderung zwischen 350 und 450 nm festzustellen. Das Spektrum des Reaktionsansatzes mit 3-Chlorbrenzcatechin wies neben dem Maximum der α-Chlormuconsäure bei 267 nm noch einen Peak bei 330 nm auf, der sich bei Erhöhung des pH-Wertes auf 9,5 verstärkte, bei pH 12,8 jedoch verschwand. Analysierte man die unbehandelte Reaktionsmischung mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie ("reverse phase"-Säule, Fließmittel 10 mM H_3PO_4, 1% Propanol), so wurde vor der α-Chlormuconsäure eine zweite Substanz eluiert. Diese entstand nicht beim Umsatz von 3-Chlorbrenzcatechin mit Chlorpyrocatechase. Dieses Enzym zeigte mit keinem Brenzcatechin 2,3-Dioxygenaseaktivität. Die Analyse der Reaktionsprodukte aus der meta-Spaltung von 3-Chlorbrenzcatechin gestaltet sich sehr schwierig, da als Produkt ein sehr labiles Säurechlorid der α-Hydroxymuconsäure,

($HOOC - CHOH = CH - CH = CH - C(=O)-Cl$, Verbindung (III) in Abb. 22 für $R_2 = H$, $R_1 = Cl$)

entsteht.

2.2.7. Absorptionsspektrum der normalen Pyrocatechase

Bei einem pH-Wert von 8,0 in Tris-HCl-Puffer (20 mM, 1 mM Mercaptoäthanol) ist die Lösung der hochgereinigten normalen Pyrocatechase (6 mg Protein/ml) deutlich rot gefärbt (s. Kap. III. 2.1.1.). Die Absorptionsspektren im sichtbaren und im ultravioletten Bereich sind in Abb. 24 dargestellt.

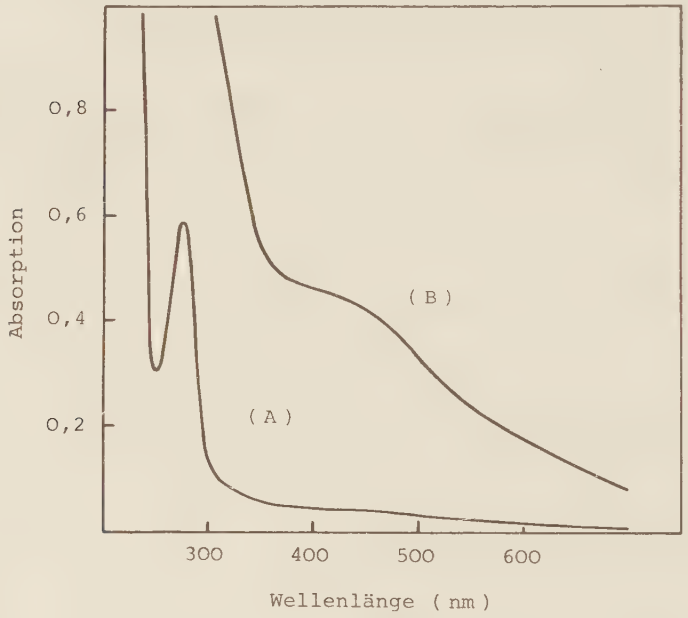


Abb. 24 Absorptionsspektrum der 29-fach angereicherten normalen Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13

Die Proteinkonzentrationen betrugen bei Kurve (A) 0,6 mg/ml, bei Kurve (B) 6 mg/ml in Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0; 1 mM Mercaptoäthanol). Der gleiche Puffer wurde in der Referenzküvette verwendet.

Das Enzym zeigte zwischen 400 und 500 nm breite Absorption mit einem Maximum bei 440 nm. Die Extinktionswerte betrugen bei 280 und 440 nm 5,8 bzw. 0,435. Das Verhältnis von A_{280nm}/A_{260nm} betrug 1,485 und der Quotient A_{440nm}/A_{500nm} = 1,345. Die spektroskopischen Eigenschaften waren denen des Enzyms aus Pseudomonas arvilla C-1 (KOJIMA et al., 1967) sehr ähnlich.

3. Enzymkinetische Analyse der Substituenteneinflüsse auf die ortho-Spaltung von Brenzcatechinen

Zur eingehenden Analyse von Substituenteneinflüssen, besonders denen des Chlors, auf die Ringspaltungsreaktion sollten mit 12 verschieden substituierten Brenzcatechinen an 3 Pyrocatechasen vergleichende Enzymkinetiken durchgeführt werden. Für vergleichende Untersuchungen waren die Darstellung einer Pyrocatechase aus einem gewöhnlichen Benzoat verwertenden Bakterium, die Herstellung nicht präparativ zugänglicher Substrate sowie Produktanalysen notwendig.

3.1. Reinigung der Pyrocatechase aus Alcaligenes eutrophus B.9

Die Pyrocatechase aus A. eutrophus B.9 zeigt für substituierte Brenzcatechine sehr ähnliche relative Umsatzraten wie die Enzyme aus anderen gewöhnlichen Benzoatverwertern (DORN, 1973). Dieses für Benzoatverwerter offensichtlich repräsentative Enzym wurde zum Vergleich mit den Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 ausgewählt.

Für die Reinigung der B.9-Pyrocatechase, wie dieses Enzym im folgenden genannt werden soll, wurden im 10 l-Fermenter auf Succinat angezogene Zellen verwendet, die nach Verbrauch des Substrates 4 Stunden mit 2 mM Benzoat induziert worden waren. Zum Zeitpunkt der Ernte wurden mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie in der Kulturflüssigkeit noch geringe Mengen Benzoat festgestellt. Die Zellen wurden in der Kälte geerntet, einmal gewaschen und mit der Frenchpresse aufgeschlossen.

15,3 ml Rohextrakt mit einer spezifischen Aktivität von 402 E/g Protein wurden an DEAE-Zellulose chromatographiert (s. Methoden Kap. 11.2.). Die B.9-Pyrocatechase wurde bei einer NaCl-Konzentration von 0,23 M eluiert. Die aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und durch Ammoniumsulfat-Fällung mit anschließender Dialyse konzentriert (s. Methoden Kap. 11.1.). Durch diese Reinigung wurde eine 8,5-fache Anreicherung bei einer Ausbeute von 62% erreicht. Mit diesem Enzympräparat (spezifische Aktivität = 3,4 E/mg Protein) wurden die kinetischen Analysen durchgeführt. Diese Pyrocatechase-Lösung wurde sterilfiltriert und verlor in 4 Wochen bei 4 °C 9% ihrer Aktivität.

3.2. Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten substituierter Muconsäuren

Für die Bestimmung der zum Teil sehr niedrigen K_m- bzw. K_i-Werte war es notwendig, den photometrischen Test für die Pyrocatechasereaktion zu verwenden (ΔA_{260nm}), der etwa zehnmal empfindlicher ist als die Warburgtechnik (O_2-Aufnahme). Die molaren Extinktionskoeffizienten (ε) für die cis,cis-Isomeren substituierter Muconsäuren in Tris-HCl-Puffer (33,3 mM, pH 8,0) waren nicht vollständig bekannt. Daher wurden die erforderlichen Werte auf folgende Weise bestimmt (s. Methoden Kap. 15.). Substituiertes Brenzcatechin wurde mit Chlorpyrocatechase zu den entsprechenden Muconsäuren umgesetzt. Der Ablauf der Reaktion wurde bei 260 nm im Spektralphotometer verfolgt. Nachdem die Extinktion über 30 min lang konstant war, wurde die Reaktion als beendet angesehen. Die Spektren wurden gegen eine Referenzküvette, welche die Komponenten der Reaktionsmischung außer Substrat enthielt, registriert und λ_{max} sowie ε bestimmt.

Die Produkte der ortho-Spaltung von Brenzcatechinen sind die cis,cis-Isomeren der Muconsäuren (HAYAISHI und HASHIMOTO, 1950; HAYAISHI et al., 1955; MASON, 1957; ELVIDGE et al., 1950). Die relative Stabilität unter alkalischen Bedingungen (EVANS et al., 1971a,b) spricht dafür, daß die in Tab. 9 aufgeführten Extinktionskoeffizienten den jeweiligen cis,cis-Isomeren zuzuordnen sind.

Tab. 9 Molare Extinktionskoeffizienten von substituierten Muconsäuren in Tris-HCl-Puffer (33,3 mM, pH 8,0; 3,3 mM Mercaptoäthanol

Substituierte Muconsäure	Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{260\ nm}$	$\varepsilon_{\lambda_{max}}$	λ_{max} (nm)
Muconsäure	16 800	17 300	257
α-Chlormuconsäure	17 100	18 300	267
β-Chlormuconsäure	12 400	12 500	259
α,γ-Dichlormuconsäure	9 700	9 900	265
α-Fluormuconsäure	14 900	15 000	261
β-Fluormuconsäure	16 000		
α-Brommuconsäure	14 400	15 700	270
α-Methylmuconsäure	18 000	18 000	260
β-Methylmuconsäure	13 900	14 300	255

Die Versuchsbedingungen bei der enzymatischen Darstellung der substituierten Muconsäuren in Lösung sind in Text und Methoden Kap. 15. und 17. beschrieben.

Nach SISTROM und STANIER (1954) sowie EVANS et al. (1971a,b) sind die Lactonasen streng spezifisch für die cis,cis-Konformation der Muconsäuren. Nimmt man das auch für die Lactonaseaktivität in den auf m-Chlorbenzoat angezogenen Zellen von Ps. Stamm B.13 an, so ist der rasche Umsatz von α- und β-Chlor- sowie von α- und β-Methylmuconsäure ein weiteres Indiz für die cis,cis-Konformation der enzymatisch synthetisierten Muconsäuren.

3.3. Enzymatische Darstellung von 3- und 4-Fluor- sowie 3-Brombrenzcatechin

Nicht alle substituierten Brenzcatechine standen in kristalliner Form zur Verfügung. Die chemische Synthese dieser Substanzen, z.B. von 3- und 4-Fluorbrenzcatechin nach CORSE und INGRAHAM (1951), ist sehr aufwendig. Im Abbauweg von Benzoat ist

3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure (DHB) [1]) die Vorstufe von Brenzcatechin. Mit Hilfe der Mutanten B.9 von Alcaligenes eutrophus (REINER, 1972; REINEKE, 1976) lassen sich auch substituierte Benzoate zu den entsprechenden DHB's umsetzen. 6- und 4-Fluor- sowie 3-Brom-DHB wurden bei der enzymatischen Darstellung zu 3- und 4-Fluor- sowie 3-Brombrenzcatechin dehydriert (s. Methoden Kap. 17.). Der tatsächliche Gehalt der Präparationen an substituiertem DHB wurde durch Umsatz mit der DHB-Dehydrogenase aus A. eutrophus an Hand des gebildeten NADH festgestellt.

Dazu wurde die DHB-Dehydrogenase aus A. eutrophus in Anlehnung an die Methode von REINER (1972) zehnfach angereichert. Der Rohextrakt von Zellen nach Anzucht auf Benzoat wurde an DEAE-Zellulose chromatographiert (s. Methoden Kap. 11.2.). Das Enzympräparat aus A. eutrophus besaß im Gegensatz zu demjenigen aus Pseudomonas Stamm B.13 den Vorteil, frei von Pyrocatechase- und Lactonaseaktivität zu sein.

Der Reaktionsansatz zur Darstellung der Fluor- und Brombrenzcatechine enthielt mit Lactat-Dehydrogenase, Pyruvat und katalytischen Mengen NAD^+ ein NAD^+-regenerierendes System. Äquimolare Mengen oder gar NAD^+ im Überschuß hätten den nachfolgenden photometrischen Test der Pyrocatechasereaktion durch starke Grundabsorption bei 260 nm so stark gestört, daß eine Messung nicht möglich gewesen wäre. Das Ende der Dehydrierung war dann erreicht, wenn sich nach Umsatz des gebildeten Brenzcatechins mit Chlorpyrocatechase die Absorption bei 260 nm nicht mehr erhöhte.

Wegen der Instabilität der Brenzcatechine mußte sichergestellt werden, daß während des Versuchszeitraums keine Umwandlung in ortho-Chinon und dessen Polymerisationsprodukte stattgefunden hatte. Dazu wurden 3 µmole des jeweiligen Brenzcatechins mit Chlorpyrocatechase in der Warburg-Apparatur umgesetzt (s. Methoden Kap. 6.b). Für ein Mol eingesetztes Substrat wurde ein

---

[1]) DHB = Hergeleitet vom Trivialnamen Dihydrodihydroxybenzoesäure

Mol O_2 ± 3% verbraucht. Die Lösungen der aus substituierten DHB's hergeleiteten Brenzcatechine wurden sofort für die Enzymkinetiken eingesetzt. Zuvor war noch sichergestellt worden, daß die Komponenten der Syntheseansätze die Pyrocatechasereaktion nicht störten.

3.4. V_{max}- und K_m- bzw. K_i-Werte von drei Pyrocatechasen für substituierte Brenzcatechine

Die im folgenden beschriebenen Experimente sollten die kinetischen Konstanten für die Ringöffnungsreaktion von substituierten Brenzcatechinen liefern. Durch Vergleich der Daten für drei Pyrocatechasen sollten die Gesetzmäßigkeiten erkannt werden, auf welche Weise Substituenten die Substratbindung und den Ablauf der Ringspaltung beeinflussen. Alle Kinetiken wurden mit den Enzympräparaten durchgeführt, die nach einmaliger Chromatographie an DEAE-Zellulose erhalten worden waren.

Bei der Aufnahme der Substratsättigungskurven wurden nach Möglichkeit die Substratkonzentrationen gewählt, die im Bereich des K_m-Wertes lagen. Bei einigen Kinetiken mit sehr niedrigen K_m-Werten war dies nicht möglich. Die niedrigste eingesetzte Substratkonzentration betrug 5 µM. Der vollständige Umsatz von 15 nmolen Brenzcatechin in 3 ml verursachte eine Extinktionsänderung von nur 0,084 Extinktionseinheiten. Dies war die untere Grenze für eine genaue Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit.

V_{max}- und K_m- bzw. K_i-Werte wurden aus den Auftragungen von $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{[S]}$ nach LINEWEAVER and BURK (1934) ermittelt.

3.4.1. Aktivität der Chlorpyrocatechase mit mehrfach chlorierten Brenzcatechinen

Die Umsatzgeschwindigkeiten von 4,5-Dichlor-, 3,4,5-Trichlor- und Tetrachlorbrenzcatechin durch die Chlorpyrocatechase waren so klein, daß sie mit dem photometrischen Test nicht bestimmt werden konnten. Dazu hätte soviel Protein in der Küvette eingesetzt werden müssen, daß die Grundabsorption bei 260 nm für eine Aktivitätsbestimmung bei dieser Wellenlänge viel zu hoch gelegen hätte. Bei den langen Meßzeiten hätte die Oxidation der Brenzcatechine zu ortho-Chinon die Ergebnisse zusätzlich verfälscht.

Mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer CH-Säule konnten Substrat, Ringspaltungsprodukt und Protein schnell getrennt werden, was die Bestimmung der Umsatzraten höherchlorierter Brenzcatechine erlaubte. Hohe Proteinkonzentrationen im Ansatz störten die Analyse der Reaktionsprodukte nicht. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Methoden Kap. 7.1. beschrieben. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit der höherchlorierten Brenzcatechine mußten 15 mM Dimethylsulfoxid als Lösungsvermittler den Reaktionsmischungen zugegeben werden. Dies beeinflußte die Chlorpyrocatechaseaktivität und die chromatographische Trennung nicht. In regelmäßigen Abständen wurden 2 µl Reaktionsmischung an einer CH-Säule direkt chromatographiert (s. Methoden Kap. 10.). Die Produkte waren stets polarer als die eingesetzten Brenzcatechine und wurden von diesen deutlich getrennt.

Das Problem bestand nun darin, der vom Schreiber aufgezeichneten Peakfläche die Menge gebildeten Produkts zuzuordnen. Eine Eichung mit authentischen Verbindungen der jeweiligen Produkte war nicht möglich, da diese nicht präparativ zugänglich sind. Die Brenzcatechinabnahme zu messen wäre wegen der relativ kleinen Extinktionskoeffizienten bei 254 nm, der Wellenlänge des empfindlicheren Detektors, und der geringen Veränderung der Peakflächen zu ungenau gewesen.

Es wurde angenommen, daß im Reaktionsansatz nur das cis,cis-Isomere der jeweiligen substituierten Muconsäure als einziges Produkt entstand.

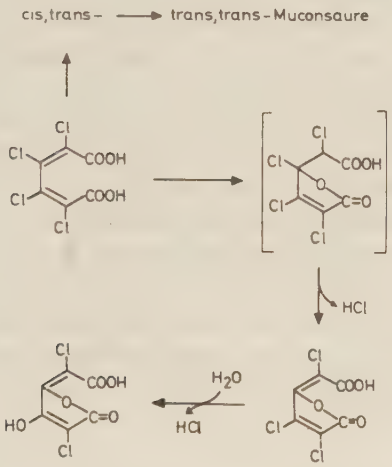


Abb. 25 Mögliche Folgeprodukte aus Umwandlungen von Chlormuconsäuren unter sauren Bedingungen am Beispiel der Tetrachlormuconsäure

Die substituierten cis,cis-Muconsäuren wandeln sich unter den sauren Bedingungen der mobilen Phase sehr leicht sowohl in die cis,trans- oder gar trans,trans-Isomeren als auch zu den Lactonen um (EVANS et al., 1971). Alle entsprechenden Muconsäuren der eingesetzten Brenzcatechine (3,5- und 4,5-Dichlor- sowie 3,4,5-Trichlor- und Tetrachlorbrenzcatechin) tragen in γ-Stellung ein Chloratom. Daher konnten aus den einfach ungesättigten chlorierten Muconolactonen die zweifach ungesättigten Lactone entstehen. EVANS et al. (1972a) wiesen diese Umwandlung für die α,γ-Dichlormuconsäure nach. Die Chloratome in Nachbarstellung

zur γ-Position sollten die Eliminierung von HCl unter Ausbildung einer Doppelbindung zusätzlich erleichtern. Auch eine hydrolytische Eliminierung des Chlorsubstituenten in β-Stellung (EVANS et al., 1971) würde die zwei konjugierten Doppelbindungen erhalten. Die Extinktionskoeffizienten von Dienchromophoren schwanken bei 254 nm zwischen 7 000 und 14 000. Damit war es möglich, dem Produktintegral bei einem angenommenen mittleren Extinktionskoeffizienten von ε = 10 000, eine Produktmenge zuzuordnen. Durch Vergleich mit bekannten Mengen an α- und β-Chlor- und α,γ-Dichlormuconsäure bzw. deren Umwandlungsprodukten konnte eine Auswertung vorgenommen werden. Somit war es möglich die Größenordnungen der Umsatzraten von 4,5-Dichlor-, 3,4,5-Trichlor- und Tetrachlorbrenzcatechin mit Chlorpyrocatechase zu bestimmen und mit den Werten der übrigen Brenzcatechine zu vergleichen. Die Bestimmungen für 4,5-Dichlor- und 3,4,5-Trichlorbrenzcatechin waren gut reproduzierbar und proportional der eingesetzten Enzymmenge. Die Werte für Tetrachlorbrenzcatechin erfüllten diese Bedingungen nicht; sie lagen in der Größenordnung des Wertes für Trichlorbrenzcatechin.

3.4.2. Zusammenstellung der kinetischen Daten

In Tab. 10a und 11 sind alle V_{max}- und K_m- bzw. K_i-Werte der normalen Pyrocatechase und der Chlorpyrocatechase aus Ps. Stamm B.13 und der Pyrocatechase aus Alcaligenes eutrophus B.9 zusammengestellt. Die relativen Umsatzraten der beiden Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 mit Protocatechuat ("4-Carboxybrenzcatechin") lagen unter 0,01% verglichen mit dem Brenzcatechinumsatz. Die Reaktion der Chlorpyrocatechase mit Brenzcatechin (0,2 mM im Testansatz) wurde durch äquimolare Mengen Protocatechuat nicht gehemmt.

Tab. 10a K_m- bzw. K_i-Werte und relative Umsatzgeschwindigkeiten substituierter Brenzcatechine (bezogen auf Brenzcatechin) für die Chlorpyrocatechase und normale Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13

	Chlorpyrocatechase				Normale Pyrocatechase			
Brenzcatechin (BC) und subst. Brenzcatechine als Substrate bzw. Inhibitoren	V_{max} (%)	v |S| = 2 µM	K_m (µM)	K_i (µM)	V_{max} (%)	v |S| = 2 µM	K_m (µM)	K_i (µM)
BC	100	100	15,6		100	100	5,43	
3-Fluor-BC	27				0,43			
4-Fluor-BC	164	293	7,85		20,2			
3-Chlor-BC	105	450	2,1		0,7	2,3		0,13
4-Chlor-BC	96	519	1,3		11,3	2,7	29,4	
3-Brom-BC	93	604	0,7		0,2			
3,5-Dichlor-BC	4	34		0,17	0,1	0,2		3,18
4,5-Dichlor-BC	0,9	7,3		0,17	nb	nb		1,44
3,4,5-Trichlor-BC	0,3	2,5		0,12	nb	nb		4,45
Tetrachlor-BC				0,30	nb	nb		11,5
3-Methyl-BC	337	151	37,1		11,0	6,7	10,1	
4-Methyl-BC	316	226	22,7		92,0	2,7	154,0	

nb = nicht bestimmt. Zur Bestimmung der Konstanten siehe Text und Methoden Kap. 7.1.

Mit den höher gereinigten Pyrocatechasen aus Pseudomonas Stamm B.13 wurden typische Kinetiken ausgewählt und zur Kontrolle wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tab. 10b zusammengefaßt.

Tab. 10b Kontrollkinetiken mit höher gereinigten Präparaten der zwei Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13

Brenzcatechin und substit. Brenzcatechine als Substrate	Chlorpyrocatechase		Normale Pyrocatechase	
	V_{max} (%)	K_m (µM)	V_{max} (%)	K_m (µM)
BC	100	13,9	100	5,12
4-Chlor-BC	93,8	1,4	10,9	28,5
3-Methyl-BC	349	34,5	11,0	13,7
4-Methyl-BC	321	22,0	94,5	163,0

Der maximale Umsatz mit Brenzcatechin (BC) entspricht 100%. Für die Messungen wurden Enzympräparate aus dem jeweils letzten Reinigungsschritt eingesetzt (vgl. Tab. 3 und 4).

Die kinetischen Konstanten haben sich durch weitere Reinigung der Enzyme nicht signifikant verändert. Damit ist vor allem für die normale Pyrocatechase wahrscheinlich, daß keine hemmende oder aktivierende Komponente die Ergebnisse (Tab. 10a) verfälschen konnte.

Tab. 11 K_m- bzw. K_i-Werte und relative Umsatzgeschwindigkeiten substituierter Brenzcatechine (bezogen auf Brenzcatechin) für die Pyrocatechase aus Alcaligenes eutrophus Stamm B.9

Brenzcatechin (BC) und subst. Brenzcatechine als Substrate bzw. Inhibitoren	V_{max} (%)	v |S| = 2 µM	K_m (µM)	K_i (µM)
BC	100	100	2,34	
4-Fluor-BC	22,9			
3-Chlor-BC	0,2	0,4		0,058
4-Chlor-Bc	7,0	2,0	13,2	
3,5-Dichlor-BC	0,1			0,29
4,5-Dichlor-BC				0,29
3,4,5-Trichlor-BC				3,18
Tetrachlor-BC				6,0
3-Methyl-BC	7,1	6,2	2,94	
4-Methyl-BC	41,3	4,3	40,0	

Zur Bestimmung der Konstanten siehe Text und Methoden Kap. 7.1.

3.4.3. Art der Hemmung

Die Hemmung des Brenzcatechinumsatzes mit der normalen Pyrocatechase durch 3,5-Dichlorbrenzcatechin war nicht kompetitiv. Bei der Auftragung von 1/v gegen 1/|S| nach LINEWEAVER und BURK (1934) schnitten sich die Geraden der ungehemmten und gehemmten Reaktion auf der Abszisse (-1/|S|). Dies zeigte den gleichen K_m-Wert aber verschiedene V_{max}-Werte an. Nach der Auftragung von v gegen v/|S| nach EADIE und HOFSTEE verliefen die Geraden parallel. Alle anderen Hemmkinetiken mit den drei Enzymen zeigten kompetitive Hemmung an.

3.4.4. Vergleich der enzymkinetischen Daten für die normale Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13 und die Pyrocatechase aus A. eutrophus B.9

Das Muster der relativen Umsatzraten von beiden gewöhnlichen Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 und A. eutrophus B.9 für substituierte Brenzcatechine war nahezu identisch. Die absoluten Zahlen für K_m- und K_i-Werte der Pyrocatechase aus A. eutrophus B.9 lagen etwa zwei- bis dreifach niedriger als diejenigen der normalen Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13. Die Verhältnisse der jeweiligen Konstanten untereinander waren für beide Enzyme jedoch gleich. Die Ergebnisse stimmen mit den Daten für Pyrocatechasen aus gewöhnlichen Aromatenabbauern fast vollkommen überein (ICHIHARA et al., 1962; LOOS et al., 1967; FUJIWARA et al., 1975; NOZAKI et al., 1970). Die Pyrocatechase aus Brevibacterium fuscum ist in ihren kinetischen Eigenschaften der Chlorpyrocatechase sehr ähnlich (NAKAGAWA et al., 1963).

3.4.5. Substituenteneinflüsse auf die Substratbindung

Zur Auswertung der enzymkinetischen Analysen ist es notwendig, den Einfluß eines Substituenten quantitativ anzugeben. HAMMETT (1935) hat den Einfluß verschiedener Substituenten in verschiedenen Stellungen auf die Dissoziation von Benzoesäure bestimmt. Er definierte die substituentenspezifische Konstante σ als

$$\sigma = \log \frac{K}{K_o} \cdot \frac{1}{\rho} \qquad (5)$$

wobei K und K_o die Dissoziationskonstanten für die substituierte bzw. unsubstituierte Benzoesäure bedeuten. ρ ist eine reaktionsspezifische Konstante, die für die Dissoziation von Benzoesäure definitionsgemäß als 1 gesetzt wurde. HAMMETT (1935) und später JAFFÉ konnten die Parallelität zwischen den Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen einer homologen Reihe einerseits und den Dissoziationskonstanten der substituierten Benzoesäuren andererseits aufzeigen. Dabei unterscheiden sich die HAMMETT-Auftragungen für verschiedene homologe Reihen lediglich in den

Werten für ρ, den Steigungen der resultierenden Geraden.

Brenzcatechin besitzt zwei deprotonierbare Hydroxylgruppen, deren Azidität durch Substituenten am aromatischen Kern beeinflußt wird. Wenn der Dissoziationsgrad der OH-Gruppen für die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes eine Rolle spielt, so sollte dies aus der HAMMETT`schen Auftragung von $\log K_m$ bzw. $\log K_i$ gegen σ an einer mehr oder weniger starken Steigung zu erkennen sein. Hierfür wurde vorausgesetzt, daß nach der Theorie von MICHAELIS und MENTEN der K_m-Wert der Gleichgewichtskonstanten K_s für die Reaktion $E + S \rightleftharpoons ES$ etwa gleich ist. Dann sind K_m- und K_i-Wert ein Maß für die Affinität des Substrates zum Enzym.

Es wurde geprüft, ob die Bindung der verschiedenen Brenzcatechine im aktiven Zentrum der Pyrocatechasen, das heißt die K_m- bzw. K_i-Werte, mit den HAMMETT`schen Substituentenkonstanten σ korrelierten (Abb. 26a,b,c). Die Stärke des Substituenteneinflusses und damit der Zahlenwert für σ ist von der relativen Stellung zum Reaktionszentrum abhängig. Bei Brenzcatechin läßt sich nicht sagen, welche der beiden OH-Gruppen oder ob beide bei der Anheftung entscheidend sind. Daher wurden die σ-Werte eingesetzt, die der Geradengleichung am besten entsprechen. Die ausführliche Begründung für diese Art der Auswertung wird in der Gesamtdiskussion gegeben.

Die für die Chlorpyrocatechase ermittelten K_m- bzw. K_i-Werte erfüllen die HAMMETT-Gleichung sehr gut, während die Konstanten der beiden gewöhnlichen Pyrocatechasen mit dieser Beziehung nur schlecht übereinstimmen (s. Abb. 26a,b,c). Eine andere Auswahl der σ-Werte schwächte die unterschiedlich gute Übereinstimmung mit der HAMMETT-Gleichung ab, kehrte die gefundene Gesetzmäßigkeit für Chlorpyrocatechase und gewöhnliche Pyrocatechasen aber nicht um.

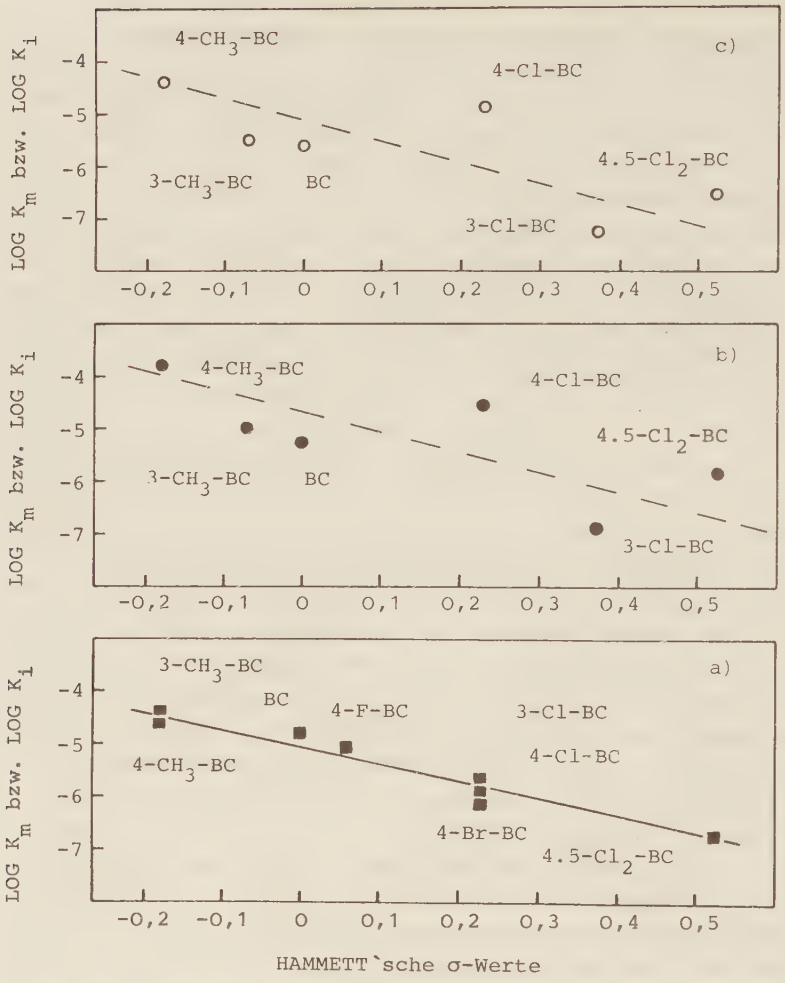


Abb. 26a,b,c Korrelation zwischen der Affinität substituierter Brenzcatechine zu verschiedenen Pyrocatechasen und der HAMMETT´schen Substituentenkonstanten σ

Die K_m- bzw. K_i-Werte sind Tab. 10a und 11 und die σ-Werte den Arbeiten von MCDANIEL und BROWN (1958) bzw. JAFFÉ (1953) entnommen. Für weitere Erklärungen zur Auftragung siehe Text.
(a) Auftragung für die Werte der Chlorpyrocatechase und
(b) der normalen Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13 sowie
(c) der Pyrocatechase aus Alcaligenes eutrophus B.9

Um auch die mehrfachchlorierten Brenzcatechine in diese Betrachtung mit einbeziehen zu können, wurde, da für diese keine σ-Werte zur Verfügung standen, die Korrelation zwischen pK-Wert und Affinität zu den Pyrocatechasen geprüft. Die pK-Werte sollten auf Grund der obigen Überlegungen den von HAMMETT bestimmten σ-Werten entsprechen. Erstere wurden daher durch Titration mit NaOH bestimmt (s. Methoden Kap. 16).

Tab. 12 pK_1-Werte von substituierten Brenzcatechinen in wäßriger Lösung (10 mM) bei 22 °C

Brenzcatechin	pK_1
Brenzcatechin	9,75
3-Cl-	8,40
4-Cl-	9,00
3.5-Cl_2-	7,55
4.5-Cl_2-	8,25
3.4.5-Cl_3-	7,00
Cl_4-	5,80
3-CH_3-	9,75
4-CH_3-Brenzcatechin	9,95

Weitere Versuchsbedingungen zur Bestimmung siehe Methoden Kap. 16.

Die in 3-Stellung substituierten Brenzcatechine sind stärkere Säuren als die entsprechend in 4-Stellung substituierten. Methylbrenzcatechine besitzen ähnlich wie das unsubstituierte Brenzcatechin höhere pK-Werte als die chlorierten Derivate. Die Azidität nimmt mit steigendem Chlorierungsgrad zu. Die pK_1-Werte der Tabelle 12 beziehen sich auf die erste Dissoziationsstufe. Die zweite Dissoziationsstufe des Brenzcatechins besitzt nach TIMBERLAKE (1957) einen pK_2-Wert von 12,8. Aus der Titrations-

kurve von Tetrachlorbrenzcatechin geht hervor, daß der pK_2-Wert unter den angegebenen Bedingungen größer als 10,5 sein muß (ohne Abbildung). Damit wird deutlich, daß unter den Testbedingungen für die Pyrocatechasereaktion im wesentlichen eine OH-Gruppe dissoziiert ist.

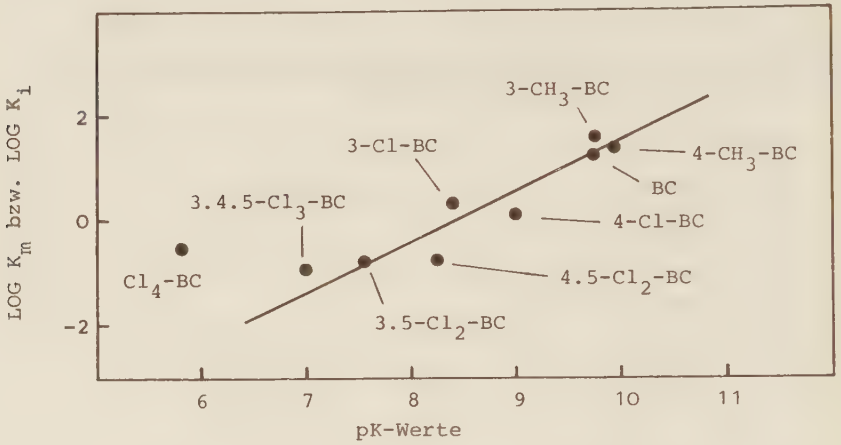


Abb. 27 Korrelation zwischen pK-Wert und Affinität von substituierten Brenzcatechinen zur Chlorpyrocatechase

Die K_m- bzw. K_i-Werte wurden Tab. 10a und die pK-Werte Tab. 12 entnommen.

Abb. 27 zeigt die erwartete Gesetzmäßigkeit, daß mit zunehmender Säurestärke der substituierten Brenzcatechine deren Affinität zur Chlorpyrocatechase ansteigt. Die Streuung der Meßpunkte enthält eine schwach ausgeprägte Regelmäßigkeit. Alle Brenzcatechine mit einem Substituenten in 3-Stellung besitzen demnach eine etwas niedrigere Affinität zur Chlorpyrocatechase als diejenigen mit freien 3- und 6-Positionen. Trägt man die entsprechenden Daten aus Tab. 10a und 11 für die beiden gewöhnlichen Pyro-

catechasen in gleicher Weise und in gleichem Maßstab auf, so zeigt sich wie bei der HAMMETT-Auftragung, daß die Meßpunkte über eine deutlich größere Fläche verteilt sind als die Konstanten für die Chlorpyrocatechase. Eine Entsprechung von Affinität und pK-Wert ist dennoch zu erkennen.

Als letzte Kontrolle der soeben dargelegten Gesetzmäßigkeit wurde die Abhängigkeit des K_m-Wertes von dem pH-Wert des Testpuffers geprüft.

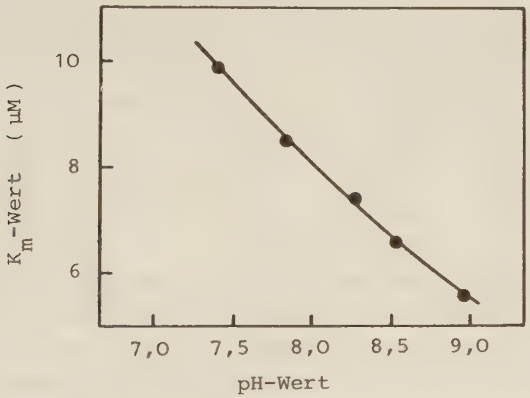


Abb. 28 Abhängigkeit des K_m-Wertes der Chlorpyrocatechase für Brenzcatechin vom pH-Wert

Die Enzymaktivitäten für die Aufnahme der Substratsättigungskurven wurden in 50 mM Tris-Acetat-Puffer mit 3,3 mM Mercaptoäthanol bei den im Diagramm eingezeichneten pH-Werten gemessen. In 3 ml Testansatz waren 50 µl Chlorpyrocatechase (nach einmaliger Reinigung an DEAE-Zellulose) ≙ 43 µg Protein und 5 - 50 µM Brenzcatechin enthalten.

Wie aus Abb. 28 zu ersehen ist, steigt der K_m-Wert mit zunehmender Wasserstoffionenkonzentration an. Bei hohem pH-Wert sind deprotonierbare Gruppen stärker dissoziiert und bedingen eine höhere Affinität zur Chlorpyrocatechase.

3.5. Temperaturoptima und Aktivierungsenergien

Die Aktivierungsenergie bestimmt weitgehend, ob und wie schnell eine chemische Reaktion abläuft. Sie gibt die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten an (ARRHENIUS,1889). Ein Enzym kann diese Energiebarriere erniedrigen und damit die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen. Diese Tatsache im Zusammenhang mit den V_{max}-Werten von Kap. III. 3.4.2. führte zu zwei Fragen: 1. Vermag die Chlorpyrocatechase die Aktivierungsenergie stärker zu erniedrigen als die gewöhnlichen Pyrocatechasen, und 2. unterscheiden sich die Aktivierungsenergien der verschieden substituierten Brenzcatechine? Dazu wurden die Temperaturoptima der drei Pyrocatechasen bestimmt.

Nach der Arrhenius-Gleichung (EGGERT, 1968, S. 772 ff)

$$\ln k = -\frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + B \quad \text{oder} \quad \log k = -\frac{E_a}{2{,}303 \cdot R} \cdot \frac{1}{T} + B$$

wurde log k gegen 1/T aufgetragen. Dabei bedeuten k = Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion, E_a = Arrhenius-Aktivierungsenergie, R = allgemeine Gaskonstante (= 1,986 cal/grad·Mol) T = absolute Temperatur (K), B = Konstante = Geschwindigkeitskonstante für $E_a = 0$.

Für die Geschwindigkeitskonstante gilt bei Substratsättigungsbedingungen $k = V_{max}/Enzym_{total}$; k ist also nur durch einen konstanten Faktor von V_{max} verschieden, was auf die Steigung der Geraden keinen Einfluß hat. Damit kann log V_{max} aufgetragen werden. Aus der Steigung errechnet sich nach Division durch 2,303·R der Wert für E_a. Nach DIXON und WEBB (1964, S. 152 ff) ist dann die Aktivierungsenthalpie

$$\Delta H^{\ddagger} = E_a - R \cdot T ,$$

wobei man für R·T den mittleren Wert von 600 cal einsetzt. Die Aktivitätsoptima der beiden gewöhnlichen Pyrocatechasen waren identisch und lagen bei 32 - 34 °C (s. Abb. 29). Die Chlorpyrocatechase zeigte ihre höchste Aktivität bei 27 - 29 °C, also

noch unterhalb der Wachstumstemperatur des Organismus. Bei Erhöhung der Temperatur über die Optima hinaus verloren alle Enzyme sehr schnell an Aktivität. Die Erhöhung der Temperatur um 10 °C bewirkte bei den drei Enzymen etwa eine Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit.

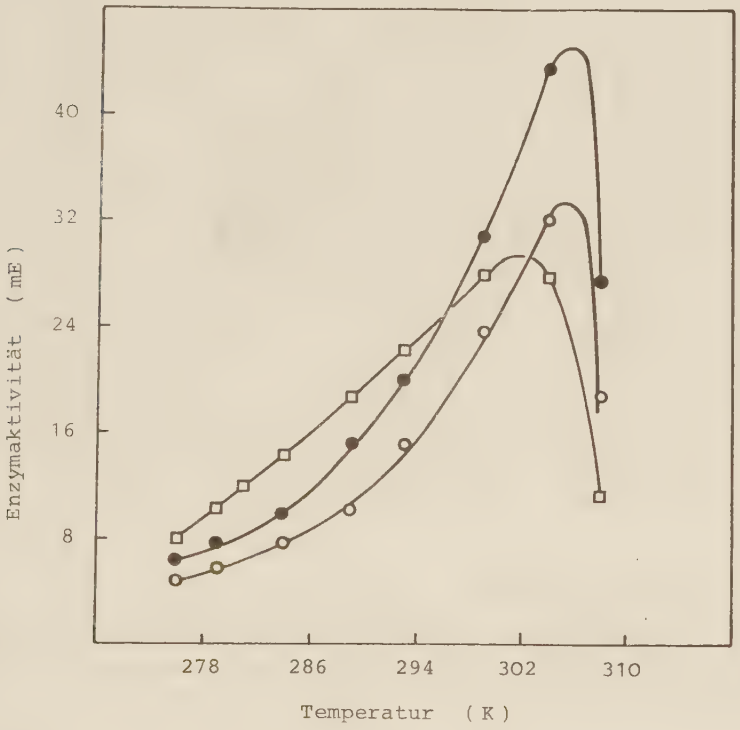


Abb. 29 Temperaturoptima der Ringspaltung von Brenzcatechin durch drei Pyrocatechasen

Die Testansätze enthielten bei der photometrischen Aktivitätsbestimmung in 3 ml 100 µmole Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 mit 10 µmolen Mercaptoäthanol, 3 µmole Brenzcatechin und folgende Proteinmengen: 50 µg Chlorpyrocatechase (□———□), 10 µg normale Pyrocatechase (●———●) bzw. 6 µg Pyrocatechase aus Alcaligenes eutrophus B.9 (○———○).

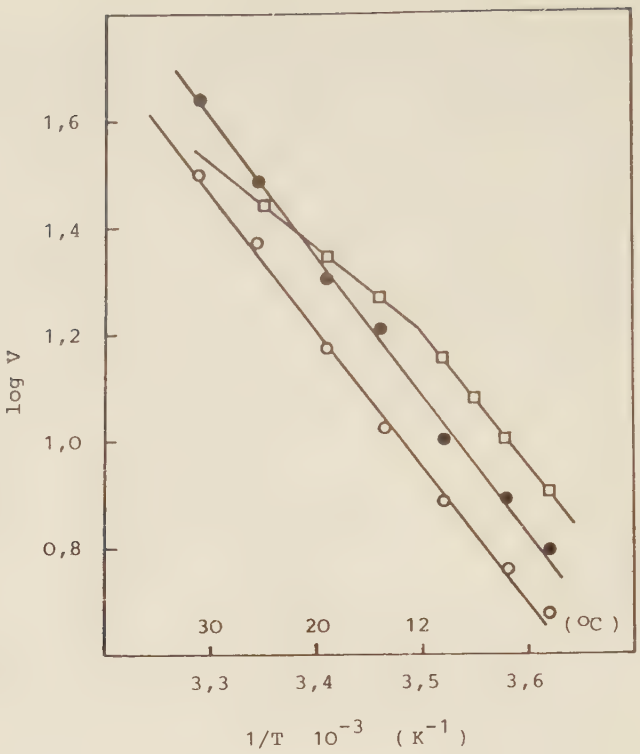


Abb. 30 Arrhenius-Auftragung der Daten aus Abb. 29

Chlorpyrocatechase (□———□), Normale Pyrocatechase (●———●), Pyrocatechase aus A. eutrophus B.9 (○———○).

In der Arrhenius-Auftragung der Daten (Abb. 30) erkennt man nur im Kurvenverlauf der Chlorpyrocatechaseaktivitäten bei etwa 12 °C einen Knick. Bei höherer Temperatur ist die Steigung geringer. Die Diskontinuität war bei den Temperaturoptimumskurven für den Umsatz von Monochlorbrenzcatechinen mit Chlorpyrocatechase noch stärker ausgeprägt (Abb. 31); dies konnte in der analogen Auftragung für die Methylbrenzcatechine nicht beobachtet werden. Die Arrhenius-Auftragungen für die Daten der gewöhnlichen Pyro-

catechasen mit 4-Chlorbrenzcatechin ließen ebenfalls keine Knicke erkennen (ohne Abbildung).

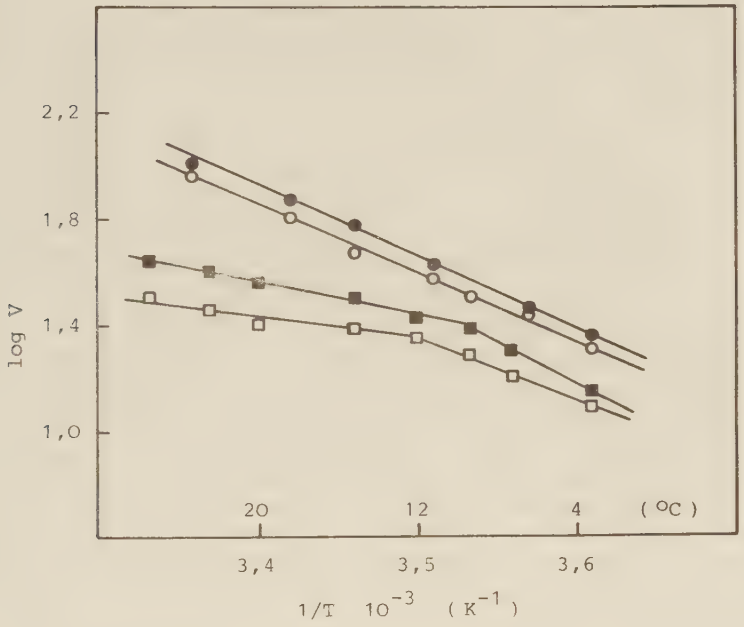


Abb. 31 Temperaturoptima der Ringspaltung von substituierten Brenzcatechinen durch die Chlorpyrocatechase (Arrhenius-Auftragung)

Weitere Versuchsbedingungen siehe Legende zu Abb. 29.

- 3-Methylbrenzcatechin
- 4-Methylbrenzcatechin
- 3-Chlorbrenzcatechin
- 4-Chlorbrenzcatechin

In Tab. 13 sind die aus den Arrhenius-Auftragungen errechneten Aktivierungsenthalpien zusammengestellt.

Tab. 13 Aktivierungsenthalpien für die Ringspaltung von substituierten Brenzcatechinen durch Pyrocatechasen

Substrat	Aktivierungsenthalpien ($\Delta H^{\ddagger}$) (kcal/mol)			
	Chlor-pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13		Normale Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B.13	Pyrocatechase aus Alcaligenes eutrophus B.9
	15 - 25 °C	4 - 10 °C		
BC	8,0	10,6	11,2	11,2
4-Chlor-BC	3,0	11,4	3,7	4,7
3-Chlor-BC	4,9	15,7	-	-
4-Methyl-BC	11,8	11,8	-	-
3-Methyl-BC	11,6	11,6	-	-

BC = Brenzcatechin. Versuchsbedingungen siehe Text und Methoden Kap. 14.

HAYAISHI et al. (1957) bestimmten für die Pyrocatechase aus Pseudomonas fluorescens Stamm 23 mit Brenzcatechin als Substrat eine Aktivierungsenergie E_a von 10,5 kcal/mol.

Im oberen Temperaturbereich zwischen 15 und 25 °C erniedrigte die Chlorpyrocatechase die Aktivierungsenergie stärker als die gewöhnlichen Pyrocatechasen. Dies galt sowohl für Brenzcatechin selbst als auch für das 4-Chlorderivat. Für die Chlorbrenzcatechine wurden wesentlich kleinere Aktivierungsenergien bestimmt als für unsubstituiertes Brenzcatechin und Methylbrenzcatechine. Die Differenz der Aktivierungsenthalpien zwischen niederen und höheren Temperaturbereichen ist für die Reaktionen der Chlorpyrocatechase mit den chlorierten Substraten am größten, verringert sich für Brenzcatechin und ist bei den Methylderivaten nicht

mehr erkennbar.

Ein nichtlinearer Verlauf der Arrhenius-Auftragung bei enzymkatalysierten Reaktionen kann durch zwei Faktoren erklärt werden (TALSKY, 1971; HAN, 1972; KUMAMOTO et al.,1971): 1. Eine Phasenänderung der Proteinstruktur verändert die katalytische Eigenschaft des Enzyms. Im Falle der Chlorpyrocatechase dürfte sich das nur auf die Katalyse der Chlorbrenzcatechin- und Brenzcatechinumsetzung auswirken, nicht aber auf die Aktivierungsenergie der Methylbrenzcatechine. 2. Bei einer aus mehreren Teilreaktionen zusammengesetzten Reaktion müßten bei verschiedenen Temperaturen verschiedene Teilreaktionen geschwindigkeitsbestimmend sein. Bei höheren Temperaturen ist diejenige mit der niedrigeren Aktivierungsenergie dominierend. Träfe dies zu, so müßten auch die Temperaturoptimumskurven der gewöhnlichen Pyrocatechasen Anomalien aufweisen, was aber nicht beobachtet wurde. Diese Fragen sollten durch Untersuchung der Einflüsse des Reaktionsmediums, wie zum Beispiel der Ionenstärke, auf den Verlauf der Arrheniuskurven beantwortet werden können.

IV. DISKUSSION

1. Abbau von m-Chlorbenzoat in Pseudomonas Stamm B.13

Der biologische Abbau substituierter Verbindungen, deren Grundkörper Bakterien als Kohlenstoffquelle verwerten, kann verlangsamt oder unvollständig sein. Im Falle der chlorierten Aromaten kann der Substituent weder chemisch verändert werden, wie es bei der Oxidation der Methylgruppe geschieht, noch als Quelle eines essentiellen Elementes dienen wie der Stickstoff einer Aminofunktion. Die gegenüber Wasserstoff höhere Raumerfüllung des Chlors sowie die stärkere Polarität der C — Cl- im Gegensatz zur C — H -Bindung können wegen der Spezifität der Enzyme und der Induktionsmechanismen Abbaureaktionen vorwiegend verlangsamend beeinflussen. Es wäre somit günstig, den Chlorsubstituenten auf einer möglichst frühen Stufe des Abbauweges zu eliminieren.

Unter den Naturstoffen ist die C — Cl -Bindung jedoch eine Rarität. Bei den wenigen Beispielen handelt es sich vor allem um Sekundärmetabolite, die unter natürlichen Bedingungen in sehr kleinen Mengen ausgeschieden werden (DOONAN, 1973; PETTY, 1961). Daher war es für Organismen kein Vorteil, Enzyme zur Spaltung der C — Cl -Bindung zu entwickeln. Diese Fähigkeit ist erst von Nutzen, seit große Mengen chlorhaltiger, synthetischer Verbindungen als C-Quelle bedeutend werden oder sich zu toxischen Konzentrationen akkumulieren (KO und LOCKWOOD, 1968; ITOKAWA et al., 1973).

Für die hydrolytische Halogenabspaltung bei aliphatischen Verbindungen haben GOLDMAN (1965), DAVIES und EVANS (1962) sowie KEARNEY et al. (1973) Beispiele erbracht. Auch bei anderen Mechanismen wie der reduktiven Dehalogenierung (Substitution von Chlor durch Wasserstoff) (BOLLAG, 1974) oder der Dehydrodehalogenierung (Eliminierung von HCl unter Ausbildung einer Doppelbindung) von γ-Chlor-α-methylmuconsäure zu 4-Methyl-5-oxo-$\Delta^{2(5H),\alpha}$-furan-2-essigsäure (GAUNT und EVANS, 1971) oder von

DDT zu DDE (LIPKE und KEARNS, 1959) sind nichtaromatische Verbindungen die Substrate. CASTRO und BARTNICKI (1968) fanden Bromabspaltung aus 2,3-Dibrompropanol nach Epoxidierung zum Endprodukt Glycerin. Die hydrolytische Spaltung der Chlor-Aromaten-Bindung ist unter physiologischen Bedingungen aus energetischen Gründen wenig wahrscheinlich (ERNEST, 1972). Es sind dennoch Beispiele beschrieben, in denen Halogen am aromatischen Ring direkt durch eine Hydroxylgruppe ersetzt werden konnte (BOLLAG, 1974). Bei eingehenden Untersuchungen des Mechanismus erwies sich die augenscheinlich hydrolytische Spaltung als oxygenolytische Reaktion (KAUFMAN, 1971; MILNE et al., 1968). In der Regel erfolgt die Eliminierung des Halogenids auf einer späteren nichtaromatischen Abbaustufe, wo wegen der leichteren nukleophilen Verdrängbarkeit des Halogens die Abspaltung begünstigt ist (HORVATH, 1972).

In den bislang untersuchten Halogenaren verwertenden Bakterien ist kein Enzym beschrieben worden, für welches der Umsatz von Halogenarenen oder die Halogeneliminierung aus einem Metaboliten als spezielle und einzige Funktion nachgewiesen wurde.Gegenüber dem Regelfall eines unvollständigen, langsamen Kometabolismus können im Ausnahmefall Mono- und Dihalogenarene rasch bis zu einer nichtaromatischen Abbaustufe kometabolisiert werden. Anschließende spontane Eliminierung des Halogenids und Totalabbau können Substratverwertung bedeuten.

Auch Pseudomonas Stamm B.13 kann den Substituenten beim Wachstum auf m-Chlorbenzoat nicht direkt eliminieren. Das Wachstumssubstrat wird zu 3- und 5-Chlor-DHB oxygeniert (DORN et al., 1974) und durch die DHB-DH zu 3- und 4-Chlorbrenzcatechin rearomatisiert. Hierbei sind die gleichen Enzyme wie beim Umsatz des natürlichen Substrates beteiligt (REINEKE, 1976). Die bei Chlorsubstitution, verglichen mit den natürlichen Substraten, verringerten Umsatzgeschwindigkeiten, werden durch Steigerung der Enzymaktivität, das heißt Mehrproduktion an Enzym, weitgehend kompensiert (REINEKE, 1976).

Die Ringspaltung der substituierten Substrate kann von der normalen Pyrocatechase mit dem 4-Chlorderivat noch mit 10% und mit 3-Chlorbrenzcatechin nur noch mit 0,7% bezogen auf Brenzcatechin (= 100%) katalysiert werden. Diese geringen Umsatzraten ermöglichen nicht nur kein Wachstum, sondern bedingen bei dem relativ raschen Umsatz in den ersten beiden Schritten die Akkumulation der toxischen Chlorbrenzcatechine (ICHIHARA et al., 1962; WALKER und HARRIS, 1972; GOLDMAN et al., 1967; HORVATH, 1971). Die Kulturmedien von auf Benzoat angezogenen Zellen färben sich bei Inkubation mit m-Chlorbenzoat violett (Eisen-Brenzcatechin-Komplex) und werden schließlich tiefbraun (Polymerisationsprodukte des o-Chinons). Die gleiche Reaktion beobachtet man bei gewöhnlichen Benzoatverwertern unter identischen Versuchsbedingungen. Ps. Stamm B.13 synthetisiert beim Wachstum auf m-Chlorbenzoat neben der drei- bis vierfachen Menge an normaler Pyrocatechase ein zweites "isofunktionelles" (STANIER und ORNSTON, 1973) Enzym, die Chlorpyrocatechase. Diese ermöglicht einen raschen Umsatz der Monochlorbrenzcatechine. Durch Dearomatisierung wird der weitere Abbau möglich. Die spezifische Aktivität mit 3-Chlorbrenzcatechin als Testsubstrat ist in Zellen nach Wachstum auf m-Chlorbenzoat ebenso hoch (150 - 250 E/g Protein) wie die spezifische Aktivität mit Brenzcatechin in Zellen nach Anzucht auf Benzoat.

Die relativen Umsatzgeschwindigkeiten unterhalb der Substratsättigung (s. Tab. 10a und 11) verdeutlichen die Vorteile der Chlorpyrocatechase. Wie zum Beispiel für die Glycolyse nachgewiesen wurde (HESS, 1973; HESS et al., 1969), arbeiten die beteiligten Enzyme nicht bei Substratsättigung. Selbst die Enzyme mit den geringsten Aktivitäten (Phosphofructokinase, ATPase) erreichen nicht die maximalen Geschwindigkeiten. Auf Grund theoretischer Überlegungen (ROLLESTON, 1972) ist für "Nichtgleichgewichtsreaktionen" eine Substratkonzentration in Höhe des K_m-Wertes physiologisch optimal. Das Gleichgewicht der Pyrocatechasereaktion liegt weit auf der Seite der Produkte (HAMILTON, 1972). Die Umsatzgeschwindigkeiten mit substituierten Brenzcatechinen wurden für die willkürlich festgelegte Substratkonzentra-

tion von 2 µM berechnet. Diese in Tab. 10a aufgeführten Werte zeigen, daß unterhalb der Sättigungskonzentrationen die Halogenbrenzcatechine von der Chlorpyrocatechase drei- bis sechsmal schneller umgesetzt werden als Brenzcatechin. Dagegen sinken die relativen Geschwindigkeiten der normalen Pyrocatechase mit Monochlorbrenzcatechinen auf 3% des Wertes für Brenzcatechin ab. Dieser Vergleich verdeutlicht den Vorteil eines niedrigen K_m-Wertes. Die generell sehr niedrigen K_m-Werte der Pyrocatechasen erscheinen bei der Toxizität der Brenzcatechine sinnvoll.

Außer in den katalytischen Leistungen unterscheiden sich die beiden Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 in einigen chemischen und physikalischen Eigenschaften. Die Molekulargewichte, beide durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation bestimmt, unterscheiden sich um 14 000 Dalton. Ob diese Differenz auf einem Konformationsunterschied oder einer unterschiedlichen Peptidkettenlänge beruht, kann nicht entschieden werden. Dazu muß der Wert für die Chlorpyrocatechase mit den für das normale Enzym angewandten Methoden kontrolliert werden. Für den niedrigen Gehalt der Chlorpyrocatechase an ionisierbaren Aminosäuren spricht sowohl das geringere Elutionsvolumen bei Ionenaustauscher-Chromatographie als auch die kleinere Wanderungsgeschwindigkeit bei der kontinuierlichen Gel-Elektrophorese.

Die Aktivitätsoptima liegen für beide Enzyme bei pH 8,0. Die Chlorpyrocatechase wird durch Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration unter pH 7,5 schnell irreversibel desaktiviert, während diese Grenze für die normale Pyrocatechase erst bei pH 6,0 liegt. Zusammen mit der nur für die Chlorpyrocatechase beobachteten Kältlabilität deuten die Ergebnisse darauf hin, daß für die Stabilität der Tertiärstruktur der beiden Pyrocatechasen verschiedene Aminosäuren verantwortlich sind.

Die aktiven Zentren der beiden Enzyme scheinen unterschiedlich aufgebaut zu sein. Die Enzymaktivitäten werden durch die "SH-Gifte" Hg^{2+}, Cu^{2+} und p-CMB verschieden stark gehemmt. Unab-

hängig von der Inkubationsdauer mit den Inhibitoren ließ sich die Hemmung der normalen Pyrocatechase durch Mercaptoäthanol weitgehend wieder aufheben. Dagegen wurde die Hemmung der Chlorpyrocatechase nach 20-stündiger Inkubation mit allen Hemmstoffen durch Mercaptoäthanol im Testansatz noch erheblich verstärkt. Für alle ausführlich untersuchten Pyrocatechasen wurden eine SH-Gruppe und Fe(III) als funktionelle Komponenten des aktiven Zentrums beschrieben (NAGAMI und SENOH, 1974; TANIUCHI et al., 1964; NAKAZAWA et al., 1965; TYSON, 1975). Die Hemmbarkeit der beiden Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 durch "SH-Gifte" und die rote Farbe der Enzympräparate weisen auch bei diesen Oxygenasen auf einen Nicht-Häm-Eisen-Proteinchromophor hin.

Die hohe Empfindlichkeit der Chlorpyrocatechase gegen Dialyse und Ionenaustauscher-Chromatographie unterscheidet diese von der normalen Pyrocatechase. Die Chlorpyrocatechaseaktivität bleibt während der Lagerung bei Raumtemperatur nahezu konstant. Daher wird angenommen, daß der Zerfall des Enzym-Eisen-Komplexes während der Lagerung sehr langsam abläuft, jedoch durch ständige Entfernung von Fe^{3+} aus dem Dissoziationsgleichgewicht bei der Chromatographie und Dialyse stark beschleunigt wird. Dies würde erklären, warum die Anreicherung der Enzymaktivität nicht gelingt. Auch GAUNT und EVANS (1971) konnten die Pyrocatechase aus Pseudomonas N.C.I.B. 9340, die beim Wachstum auf 4-Chlor-2-methylphenoxyacetat 5-Chlor-3-methylbrenzcatechin zur entsprechenden Muconsäure umsetzt, nicht anreichern. Eine sechswöchige Lagerung bei -20 ^{o}C inaktivierte dieses Enzym jedoch nicht. Die vorliegenden chemischen und physikalischen Unterschiede der beiden Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 beantworten nicht die Frage nach Herkunft und Homologien in den Aminosäuresequenzen, was weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben muß.

Die Chlorpyrocatechase wird bei Inkubation von Ps. Stamm B.13 mit m-Methylbenzoat induziert und weist sehr hohe Umsatzgeschwindigkeiten mit Methylbrenzcatechinen auf (s. Tab. 10a). Das deutet auf eine Funktion des Enzyms im Methylaromatenabbau hin. Der Organismus vermag jedoch m-Methylbenzoat nicht als Wachs-

tumssubstrat zu nutzen. Die Zellen setzen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat m-Methylbenzoat und Monomethylbrenzcatechine sehr schnell zu den methylsubstituierten Muconolactonen um, welche in 90 - 98%-iger Ausbeute akkumuliert werden. Bei der sich anschließenden Reaktion erfolgt im Falle der nicht isoelektronischen chlorierten Substrate die Chlorideliminierung (KNACKMUSS, persönliche Mitteilung). Wenn die Methylgruppe in einleitenden Reaktionen nicht oxidiert wird, werden methylaromatische Verbindungen hauptsächlich über den meta-Weg abgebaut (SEIDMAN et al., 1969). Nach diesen Befunden ist es unwahrscheinlich, daß die Chlorpyrocatechase aus dem Methylaromatenstoffwechsel stammt.

Bei der Lactonisierung der Muconsäuren in den Abbauwegen von Benzoat und m-Chlorbenzoat müssen ebenfalls verschiedene Enzyme wirksam sein. Denn nach Anzucht auf unsubstituiertem Substrat sind nur Spuren von "Chlorlactonaseaktivität" nachweisbar, während Rohextrakte aus Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat unsubstituierte cis,cis-Muconsäure nur sehr langsam umsetzen. Diese Lactonase ist nicht generell unspezifischer geworden, sondern besitzt eine veränderte Spezifität für substituierte Substrate.

EVANS et al. (1971a) konnten in Zellen von Pseudomonas N.C.I.B. 9340 nach Anzucht auf 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D) keine Lactonaseaktivität für α-Chlor- und unsubstituierte cis,cis-Muconsäure nachweisen, wohl aber für α,γ-Dichlor- und β-Chlormuconsäure. Auf Grund dieser und anderer Parallelitäten zwischen dem 2,4-D-Abbau mit Pseudomonas N.C.I.B. 9340 und der Verwertung von m-Chlorbenzoat durch Ps. Stamm B.13 kann nicht ausgeschlossen werden, daß in Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat zwei "Chlorlactonasen" vorhanden sind.

Die ersten faßbaren Produkte der Lactonisierung von β-Halogenmuconsäuren sind die zweifach ungesättigten 5-Oxo-$\Delta^{2(5H)}$,α-furan-2-essigsäuren (EVANS et al., 1971a,b; GAUNT und EVANS, 1971; HARPER und BLAKLEY, 1971; SHARPEE et al., 1973; KNACKMUSS, persönliche Mitteilung). Für die Eliminierung des α-ständigen

Halogens aus Monohalogenmuconsäuren ist der Mechanismus noch unbekannt. DUXBURY et al. (1970) fanden beim Abbau von 2,4-Dichlorphenoxyacetat, daß der α-Chlorsubstituent in α,γ-Dichlormuconsäure erst nach Lactonisierung, Dehydrodechlorierung, Delactonisierung, Reduktion der Doppelbindung und Esterspaltung auf der Stufe von Chlorsuccinat reduktiv eliminiert wird. Auf Grund der Ergebnisse mit Ps. Stamm B.13 scheinen die Abbausequenzen von α- und β-Chlormuconsäure bei β-Hydroxymuconsäure oder einen Schritt vorher in 5-Oxo-$\Delta^{2(5H),\alpha}$-furan-2-essigsäure zu konvergieren. Dies erfordert nach Isomerisierung der α-Chlormuconsäure ebenfalls eine Dehydrodechlorierung des chlorierten Muconolactons.

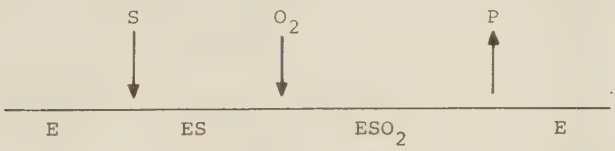
Die Enzyme des β-Ketoadipinsäure-Weges, ausgehend von Protocatechusäure, sind außerordentlich spezifisch für die carboxylierten Substrate (ORNSTON, 1966a,b; ORNSTON und STANIER, 1966). So zeigen auch weder Chlorpyrocatechase noch normale Pyrocatechase Aktivität mit Protocatechuat. Bei der Eliminierung der Carboxylgruppe im Protcatechuat-Weg verbleiben die Bindungselektronen formal beim γ-Kohlenstoffatom des Lactons. Dagegen wird Chlor als Cl^- unter Mitnahme der Bindungselektronen abgespalten. Dieser Abbauweg ist demnach für die Umsetzungen der chlorierten Metabolite ungeeignet.

Aromatische Verbindungen mit elektronenabziehenden Substituenten (-COOH, Acrylsäurerest in Zimtsäure, -Halogen) werden bevorzugt über den β-Ketoadipinsäure-Weg abgebaut (SEIDMAN et al.,1969), alkylierte Aromaten dagegen über den meta-Weg (ORNSTON, 1971).

2. Analyse von Substituenteneffekten auf die Ringöffnung von Brenzcatechinen

Unsubstituiertes Brenzcatechin ist eine symmetrische Verbindung. Die zwei Kohlenstoffatome C1 und C2 und die beiden Hydroxylgruppen sind für die Substratbindung und den Reaktionsablauf gleichwertig. Nach Einführung eines Substituenten besitzen die beiden OH-Gruppen jedoch unterschiedliche Azidität. Nach der Bindung an das aktive Zentrum der Pyrocatechase ist für die Aktivierung des Substratmoleküls die relative Position von Substituent und neueingetretenem Sauerstoffsubstituenten von entscheidender Bedeutung (vgl. Abb. 32).

Im Folgenden soll für die Diskussion der kinetischen Daten ein hypothetischer Reaktionsmechanismus formuliert und begründet werden (Abb. 32). Durch Anwendung spektroskopischer Methoden wie UV- und ESR-Spektroskopie sowie kinetischer Analysen erhielt man Informationen über den Reaktionsmechanismus von ringspaltenden 1,2-Dioxygenasen (NAKAZAWA et al., 1972a,b; KOJIMA et al., 1967; HAYAISHI, 1969). NOZAKI (1974) formulierte für den Reaktionsablauf folgende Reihenfolge:



Dabei bedeuten E = 1,2-Dioxygenase, S = 1,2-Diphenol und P = cis,cis-Muconsäure. FUJISAWA et al. (1972b) konnten für die Protocatechuat-1,2-Dioxygenase nachweisen, daß die Abreaktion des ternären Komplexes ESO_2 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

Die aus der Literatur bekannten Daten legen für die 1,2-Dioxygenasereaktion einen Mechanismus nahe, welcher den einleitenden Reaktionen der elektrophilen Substitution analog ist (GIBSON,

1968). Da der Abbau aromatischer Verbindungen stets über nukleophile 1,2- bzw. 1,4-Diphenole als Zwischenprodukte verläuft, scheint der Angriff der Dioxygenasen elektrophil zu erfolgen.

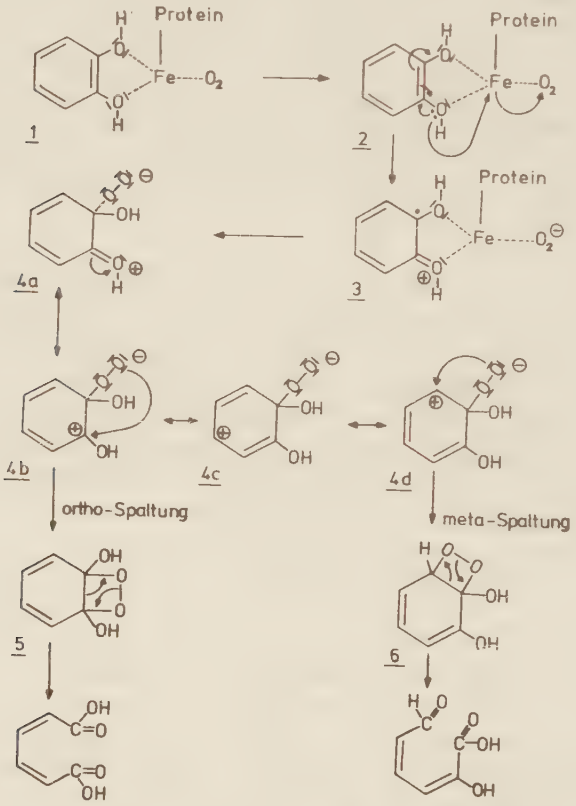


Abb. 32 Hypothetische Reaktionsmechanismen der ortho- und meta-Pyrocatechasereaktion

Bis zur Ausbildung der σ-Komplexe könnten elektrophile aromatische Substitution und Dioxygenierung gleichsinnig verlaufen. Während bei der Substitution der σ-Komplex unter H^+-Abspaltung rearomatisiert, kann bei der Dioxygenierung unter dem Einfluß des

Enzyms Peroxidbildung und schließlich Isomerisierung zur cis,cis-Muconsäure eintreten. Bis zur Bildung des hypothetischen Peroxids gleicht die Reaktion eher der elektrophilen Addition an eine aliphatische Doppelbindung. Man nimmt allgemein an, daß der Übergangszustand, der zur Bildung des σ-Komplexes durchschritten wird, die höchste freie Aktivierungsenthalpie $\Delta G^{\ddagger}$ der gesamten Reaktion besitzt. Da man die Energielage der Übergangszustände nicht kennt, setzt man diese näherungsweise gleich derjenigen der σ-Komplexe. Die damit verbundene Ungenauigkeit wird als klein angenommen (ORGANIKUM, 1970, S. 328 ff).

Nach der Theorie von EYRING und POLANY (ORGANIKUM, 1970, S. 152 ff) ist die Reaktionsgeschwindigkeit der freien Aktivierungsenthalpie umgekehrt proportional. Da die langsamste Teilreaktion die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion bestimmt, sollten die Energieinhalte der σ-Komplexe den V_{max}-Werten der Pyrocatechasereaktionen umgekehrt proportional sein. Die in ortho- oder para-Stellung zum eingetretenen Substituenten (-O— $O^{\sim}$) aufgetretenen positiven Ladungen (s. Abb. 32) sind durch Delokalisierung mesomeriestabilisiert. Dieser σ-Komplex ist um so energieärmer, je mehr diese Teilladungen delokalisiert werden können.

Bereits vorhandene Substituenten am aromatischen Kern können die Ausbildung und Stabilisierung der σ-Komplexe beeinflussen.

1. Induktiver Effekt: Ein Substituent mit geringerer Elektronegativität als das ihn tragende C-Atom - wie etwa die Methylgruppe - kann die positive Ladung etwas kompensieren (+I-Effekt). Ein Substituent mit (-)I-Effekt erschwert eine Stabilisierung durch zusätzliche Positivierung des Systems.
2. Mesomerer Effekt: Ein Substituent, der freie Elektronenpaare zur Verfügung stellen kann, vergrößert den Bereich, über den die positive Ladung delokalisiert werden kann. Durch diesen +M-Effekt kann der Energieinhalt des σ-Komplexes nur erniedrigt werden, wenn der Erstsubstituent ortho oder para zum neueingetretenen steht. (-)M-Substituenten erhöhen den Energieinhalt am wenigsten in meta-

Stellung. Bei Substituenten mit (-)I- und +M-Effekt überwiegt im stark elektrophilen σ-Komplex stets der +M-Effekt. Zu diesen Substituenten gehören auch die Halogene, bei denen im aromatischen Grundzustand der (-)I- den +M-Effekt übertrifft und somit substitutionserschwerend wirkt.

3. Sterischer Effekt: Der Erstsubstituent kann durch seine Raumerfüllung den Angriff des zweiten Substituenten behindern.

Diese drei Faktoren beeinflussen bei chemischen Reaktionen die Bildungsgeschwindigkeiten der ortho-, para- und meta-substituierten Produkte verschieden stark (kinetische Kontrolle der Reaktion) und somit die Zusammensetzung des Produktgemisches. In der enzymkatalysierten Reaktion ist die Angriffsstelle des Zweitsubstituenten durch die Enzymspezifität festgelegt. Damit können sich die unterschiedlichen Energieinhalte der σ-Komplexe nur in der Bildungsgeschwindigkeit eines spezifischen Isomeren ausdrükken.

Die HAMMETT`sche Substituentenkonstante σ ist ein Maß für die Summe aus induktivem und mesomerem Effekt eines Substituenten (s. Kap. 3.4.6.). Da die Konstanten aus den pK-Werten von substituierten Benzoesäuren errechnet wurden, können auch die pK-Werte der Brenzcatechine als Maßzahlen für die elektronenanziehende oder -abstoßende Kraft eines Substituenten angesehen werden. σ erhält ein positives (bzw. negatives) Vorzeichen, wenn der Substituent das Reaktionszentrum positiviert (bzw. negativiert).

2.1. Substituenteneinflüsse auf die Substratbindung

Im folgenden soll versucht werden, die durch die HAMMETT`schen Substituentenkonstanten ausgedrückten Substituenteneinflüsse auf die Substratbindung an die Pyrocatechase zu deuten. Aus Abb. 26a,b,c und Abb. 27 erkennt man:

1. Die HAMMETT`sche Beziehung wird von den K_m- bzw. K_i-Werten der Chlorpyrocatechase gut erfüllt. Dagegen ergibt eine ent-

sprechende Auftragung der Werte bei den gewöhnlichen Pyrocatechasen keine Korrelation. Die Chlorpyrocatechase besitzt gegenüber den gewöhnlichen Pyrocatechasen sehr geringe Stereospezifität, so daß die polaren Substituenteneffekte für die Anheftung der substituierten Brenzcatechine an das Enzym maßgebend sein müssen.

2. Für die Pyrocatechasen aus Pseudomonas Stamm B.13 und Alcaligenes eutrophus B.9 läßt sich qualitativ ablesen, daß Elektronendonatoren, zum Beispiel $-CH_3$, durchweg die Affinität erniedrigen, das heißt zu hohen K_m-Werten führen, während Elektronenacceptoren wie Halogene die Affinität erhöhen, was sich in kleinen K_m- bzw. K_i-Werten ausdrückt.

Mit steigendem pH-Wert nimmt die Dissoziation der ersten Hydroxylgruppe von Brenzcatechin zu. Gleichzeitig verringert sich der K_m-Wert der Chlorpyrocatechase für Brenzcatechin, was mit der obigen Beobachtung übereinstimmt.

In der Auftragung des pK-Wertes gegen log K_m bzw. log K_i in Abb. 27 weicht der K_i-Wert von Tetrachlorbrenzcatechin stark von der Gesetzmäßigkeit ab. Trotz der hohen Azidität der ersten Hydroxylgruppe ist das Gesamtmolekül sehr lipophil. Dafür spricht die geringe Wasserlöslichkeit und die im Vergleich zu Trichlorbrenzcatechin sehr hohe Retentionszeit bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an der unpolaren CH-Phase. Diese von den anderen Brenzcatechinen stark abweichende Eigenschaft könnte für die Anheftung an die Substratbindungsstellen der Pyrocatechasen hinderlich sein.

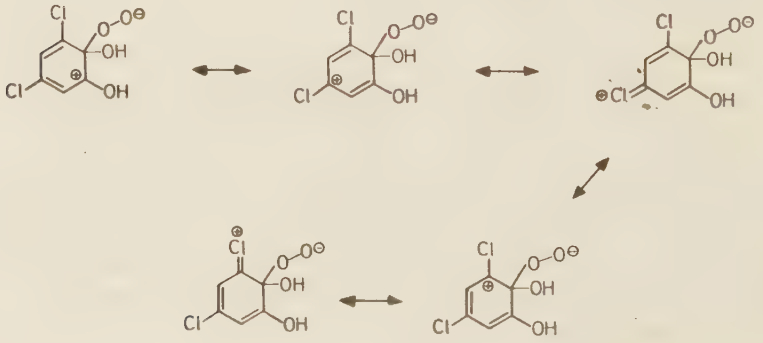
2.2. Substituenteneinflüsse auf die Umsatzgeschwindigkeit

Da die beiden isomeren Monomethyl- bzw. Monochlorbrenzcatechine durch die Chlorpyrocatechase jeweils gleich schnell umgesetzt werden und letztere V_{max} von Brenzcatechin selbst erreichen, wird angenommen, daß die durchlaufenen σ-Komplexe der 3- und 4-substituierten Brenzcatechine optimal stabilisiert sind. Beim Angriff des Sauerstoffs können damit folgende σ-Komplexe entstehen:

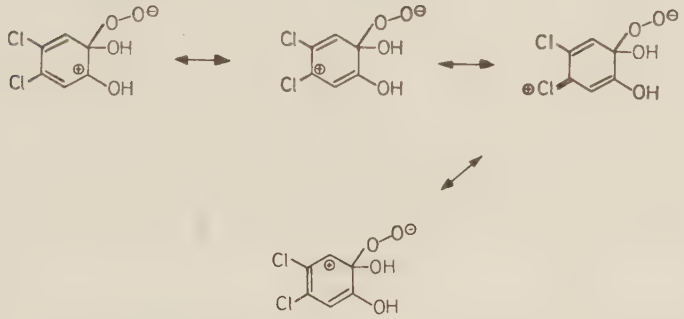
Beispiel 3-Chlorbrenzcatechin:

Beispiel 4-Chlorbrenzcatechin:

Der Chlorsubstituent kann sich in ortho- und para-Stellung zum Sauerstoff durch Konjugation an der Delokalisierung der positiven Ladung beteiligen. Es treten zusätzliche mesomere Strukturen auf. Tritt der Sauerstoff in meta-Stellung zu den Chlorsubstituenten ein, so sind keine zusätzlichen mesomeren Strukturen formulierbar. Von den beiden Dichlorbrenzcatechinen wird 3,5- fünfmal schneller durch die Chlorpyrocatechase umgesetzt als 4,5-Dichlorbrenzcatechin. Die Erklärung für diese Differenz ist, daß sich im 3,5-Dichlorbrenzcatechin beide Chlorsubstituenten an der Mesomerie beteiligen können.

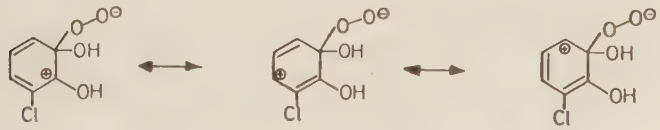


Dagegen muß im 4,5-Dichlorbrenzcatechin einer der Substituenten metaständig zum eintretenden Sauerstoff sein und kann deshalb durch den (-)I-Effekt voll reaktionsverlangsamend wirksam werden.

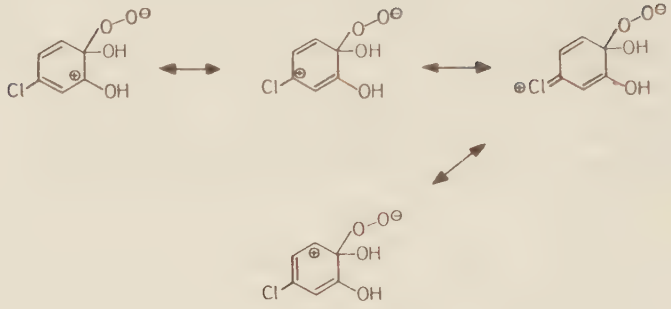


Wegen der sehr verschiedenen Umsatzraten für 3- und 4-substituierte Brenzcatechine durch die gewöhnlichen Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 und A. eutrophus B.9 (s. Tab. 10a und Tab. 11) müssen für die 3-substituierten Brenzcatechine weniger stabilisierte σ-Komplexe angenommen werden als für die 4-substituierten Brenzcatechine. Eine zwanglose Erklärung auf der Basis des postulierten Oxygenierungsmechanismus ist nur dann möglich, wenn aktiviertes O_2 ausschließlich in der 1-Position eintritt.

Beispiel 3-Chlorbrenzcatechin:

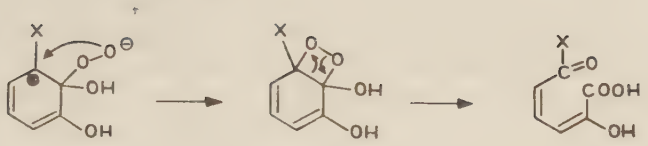


Beispiel 4-Chlorbrenzcatechin:



Nur beim 4-Substitutionsisomeren ist eine zusätzliche mesomere Stabilisierung des σ-Komplexes möglich. Diesen Annahmen liegt die Auswahl der σ-Werte für die Auftragung der log V_{max}-Werte nach der HAMMETT-Beziehung zugrunde (s. Abb. 33a,b).

Die bei der normalen Pyrocatechase als Nebenreaktion beobachtete meta-Spaltung von 3-Methylbrenzcatechin erfordert nach FUJIWARA et al. (1975) den Angriff des Sauerstoffs in Nachbarstellung zum Substituenten (vgl. Abb. 22). Die Autoren fanden für die meta-Spaltung einen wesentlich höheren K_m-Wert für Sauerstoff als bei der ortho-Spaltung, weshalb erstere als eine durch den "unphysiologischen" Substituenten verursachte Störung der normalen Ringöffnungsreaktion angesehen werden muß. Diese Daten lassen folgende Vermutung zu: 3-Substituiertes Brenzcatechin wird offenbar im aktiven Zentrum zum Teil "falsch" gebunden (gewissermaßen als 6-substituiertes Brenzcatechin). Da die Methylgruppe am Nachbarkohlenstoffatom die positive Ladung besonders stabilisiert(s. Reaktionsmechanismus Abb. 32) , kann die Dioxetan-Bildung und Ringöffnung im Sinne einer meta-Spaltung ablaufen.



Bei der Anwendung der HAMMETT`schen Beziehung auf die aromatische elektrophile Substitution müssen folgende Einschränkungen beachtet werden: Besitzt der Erstsubstituent einen +M-Effekt wie Halogen und Methylgruppe, so treten Abweichungen von der HAMMETT-Gleichung auf (BROWN und OKAMOTO, 1958). Die HAMMETT`schen σ-Werte wurden für neutrale Verbindungen im Grundzustand - Dissoziation von substituierten Benzoesäuren - bestimmt. Diese waren für die Korrelation mit der Substratbindung von substituierten Brenzcatechinen an die Pyrocatechasen geeignet. Kommt es dagegen zwischen dem Erstsubstituenten und dem positiven Reaktionszentrum des Substratmoleküls zu einer Konjugationswechselwirkung, so wird der σ-Komplex sehr viel stärker stabilisiert, als es den σ_{para}- oder σ_{ortho}-Werten entspricht (BROWN und OKOMOTO, 1957). Ein +M-Substituent wird mit einem positiv geladenen Mesomeriesystem stärker in Wechselwirkung treten als mit einem neutralen. Steht der Erstsubstituent in meta-Stellung zum neueingetretenen, sokönnen sich die freien Elektronenpaare nicht an der Konjugationswechselwirkung beteiligen. Daher ändert sich der σ_{meta}-Wert nicht. Für die Interpretation der V_{max}-Werte der Chlorpyrocatechase und der normalen Pyrocatechase wurden deshalb die von BROWN und OKAMOTO (1957) korrigierten σ^+-Werte verwendet. Nach WELLS (1963) unterscheiden sich die σ_{ortho}-Werte für Chlor, Brom und Methylgruppe nur geringfügig von denen der para-Stellung. σ_{ortho} (0,24) und σ_{para} (0,056) von Fluor differieren dagegen erheblich. Auf Grund dieser Zusammenhänge wurden an Stelle der σ_{ortho}-Werte von Chlor, Brom und Methylgruppe die korrigierten σ^+-Werte der para-Stellung verwendet.

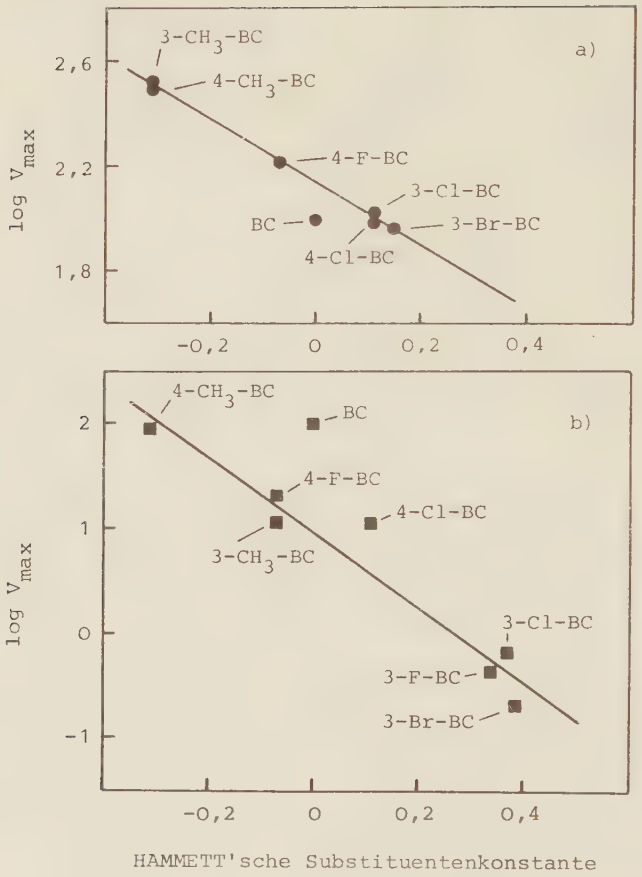


Abb. 33a,b Korrelation zwischen V_{max} der Pyrocatechasereaktion und der Substituenteneigenschaft

a) HAMMETT-Auftragung der V_{max}-Werte der Chlorpyrocatechase. Es wurden nur σ^+-Werte nach BROWN und OKAMOTO (1957) eingesetzt.

b) HAMMETT-Auftragung der V_{max}-Werte der normalen Pyrocatechase. Für 4-CH_3-, 4-Cl- und 4-F-BC wurden die σ^+_{para}-Werte eingesetzt und für 3-CH_3-, 3-F-, 3-Cl- und 3-Br-BC die σ_{meta}-Werte.

Die Auswahl der σ-Werte wird im Text begründet. Die V_{max}-Werte wurden Tab. 10a entnommen.

Für die Auswertung der kinetischen Daten wurden diejenigen Substituentenkonstanten ausgewählt, mit denen eine optimale Erfüllung der HAMMETT'schen Beziehung bzw. minimale Abweichung von der Linearität erzielt wurde. Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus versucht die Einflüsse der Substituenten auf die Pyrocatechasereaktion widerspruchsfrei zu deuten.

Die V_{max}-Werte der Chlorpyrocatechase mit substituierten Brenzcatechinen erfüllen offensichtlich die HAMMETT-Gleichung sehr viel besser als die entsprechenden Daten der normalen Pyrocatechase. Eine andere Auswahl der σ-Werte kann diese Gesetzmäßigkeit etwas verändern, aber nicht umkehren. Damit hat sich gezeigt, daß die Umsatzraten von substituierten Brenzcatechinen mit der Chlorpyrocatechase wie auch die Affinität des Enzyms für diese Substrate fast ausschließlich von den polaren Eigenschaften der Substituenten bestimmt werden. Lediglich der V_{max}-Wert von Brenzcatechin weicht etwas von der resultierenden Geraden ab. Für 3-Fluorbrenzcatechin stand kein korrigierter σ_{ortho}-Wert zur Verfügung, da die σ-Werte des Grundzustandes von ortho- und para-Stellung nicht gleich sind.

Die Umsatzraten der normalen Pyrocatechase werden im wesentlichen auch von den elektronischen Eigenschaften der Substituenten bestimmt. Diese sind jedoch von starken sterischen Einflüssen überlagert. Die hohe Stereounspezifität der Chlorpyrocatechase ist eine wesentliche Voraussetzung dafür, substituierte Brenzcatechine rasch umsetzen zu können. Somit ist eine notwendige Bedingung dafür erfüllt, daß Pseudomonas Stamm B.13 halogensubstituierte aromatische Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten kann.

Die negative Steigung der Geraden in Abb. 33a und b besagt, daß Elektronendonatoren die Reaktionsgeschwindigkeit beschleunigen, während Elektronenacceptoren wie Chlor verlangsamend wirken. Da man mit V_{max} die langsamste Teilreaktion mißt, muß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt eine elektrophile Reaktion sein. Die Ausbildung des σ-Komplexes ist in dem hypothetischen

Mechanismus der Pyrocatechasereaktion der einzige elektrophile Teilschritt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der normalen Pyrocatechase werden durch die Substituenteneigenschaften sehr viel stärker beeinflußt als diejenigen der Chlorpyrocatechase. Dies geht aus der dreifach größeren Geradensteigung der HAMMETT-Auftragungen hervor (Abb. 33a,b). Die Ergebnisse wurden unter der Annahme diskutiert, daß nur die Geschwindigkeit einer Teilreaktion diejenige der Gesamtreaktion bestimmt.

2.3. Substituenteneinflüsse auf die Aktivierungsenergie

Die Geschwindigkeitskonstante k einer Reaktion ist der freien Aktivierungsenthalpie $\Delta G^{\ddagger}$ umgekehrt proportional. Diese Größe setzt sich aus einem Enthalpie- ($\Delta H^{\ddagger}$) und einem Entropie-Term ($-T\Delta S^{\ddagger}$) zusammen. Nach der Gleichung $\Delta H^{\ddagger} = E_a - RT$ war die Aktivierungsenthalpie aus der Arrhenius-Auftragung ermittelt worden. Schreibt man einmal die logarithmierte Form der Arrhenius-Gleichung unter die Bestimmungsgleichung für $\Delta G^{\ddagger}$, so werden einige Entsprechungen deutlich.

$$\Delta G^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} - T\Delta S^{\ddagger} \qquad (6)$$

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln k_o \qquad (7)$$

Da $\Delta G^{\ddagger} \sim \frac{1}{\ln k}$ ist und E_a dem Enthalpie-Term proportional ist, muß $\ln k_o$, auch "sterischer Faktor" genannt, den Entropie-Term enthalten. Auf die Bedeutung der Aktivierungsentropie ($\Delta S^{\ddagger}$) für Enzymreaktionen haben WESTHEIMER (1962) sowie LEHRER und BARKER (1970) hingewiesen. Dies scheint auch für die Pyrocatechasereaktionen der Fall zu sein, da den hohen Arrhenius-Aktivierungsenergien (E_a) hohe V_{max}-Werte gegenüberstehen. Dieser Widerspruch löst sich jedoch auf, wenn man die $\Delta S^{\ddagger}$-Werte und daraus die freie Aktivierungsenthalpie $\Delta G^{\ddagger}$ berechnet. Dazu wurden die folgenden von LOW et al. (1973) vorgeschlagenen Formeln verwendet:

$$\Delta S^{\ddagger} = 4{,}576\ (\log k - 10{,}753 - \log T + \frac{E_a}{4{,}576\ T})$$

k ist die Geschwindigkeitskonstante, ausgedrückt in sec^{-1}, und gleich dem Produkt aus V_{max}/mg Protein und dem Faktor

$$\frac{1{,}56 \times 10^{5}\ mg}{mmole}\ \frac{1\ min}{60sec}\ \frac{10^{-3}\ mmole}{\mu mole}$$

Da die Chlorpyrocatechase nicht als reines Enzympräparat zur Verfügung stand, konnte V_{max} nicht in den vorgeschlagenen Zahlenwerten angegeben werden. Daher wurde log V_{max} durch log $(V_{rel} \cdot B)$ = log V_{rel} + log B ersetzt. V_{rel} sind die relativen V_{max}-Werte, bezogen auf die maximale Umsatzrate von Brenzcatechin = 100, und B ist eine enzymspezifische Konstante von unbekannter Größe. Die $\Delta G^{\ddagger}$-Werte der Pyrocatechasereaktion verschieden substituierter Brenzcatechine lassen sich somit bei einem Enzym vergleichen, da ein konstanter Summand die absoluten Differenzen nicht beeinflußt. $\Delta S^{\ddagger}$ und $\Delta G^{\ddagger}$ sind keine Absolutwerte. In Tab. 14 sind die nach Gleichung (6) berechneten Werte für die freie Aktivierungsenthalpie zusammengestellt. Diese geben die erwartete Korrelation mit den V_{max}-Werten wieder: je größer $\Delta G^{\ddagger}$ ist, um so langsamer verläuft die Reaktion. Die Energiebarriere (freie Aktivierungsenthalpie) ist für die Reaktion der Methylbrenzcatechine am kleinsten und für die Chlorbrenzcatechine am größten. Die $\Delta G^{\ddagger}$-Werte der drei Pyrocatechasen sind nicht vergleichbar. Daher kann man auf Grund der Aktivierungsenthalpien lediglich feststellen, daß die Chlorpyrocatechase ein besserer Katalysator ist als die beiden gewöhnlichen Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 und A. eutrophus B.9. Dies ist neben der Unspezifität die zweite wichtige Voraussetzung für die gesteigerte Umsatzleistung mit substituierten Brenzcatechinen durch die Chlorpyrocatechase. Auf Grund der für dieses Enzym ermittelten Daten verringern Elektronenacceptoren wie Chlor die Aktivierungsenthalpie $\Delta H^{\ddagger}$ und erniedrigen die Aktivierungsentropie auf einen großen negativen Zahlenwert für $\Delta S^{\ddagger}$. Der Substituent Methyl zeigt einen gegenläufigen Effekt.

Tab.13 Freie Aktivierungsenthalpie für die Ringspaltung substituierter Brenzcatechine durch verschiedene Pyrocatechasen

Substrat	V_{rel} (%)	E_a $\left(\frac{kcal}{mol}\right)$	$\Delta H^{\ddagger}$ $\left(\frac{kcal}{mol}\right)$	$\Delta S^{\ddagger}$ +4,576·logB (e.u.)	$\Delta G^{\ddagger}$ +1350·logB $\left(\frac{kcal}{mol}\right)$
Chlorpyrocatechase aus Ps. Stamm B.13					
BC	100	8,63	8,03	-22,10	14,55
4-Cl-BC	96,0	3,59	2,99	-39,27	14,58
3-Cl-BC	105,3	5,53	4,93	-32,51	14,52
4-CH_3-BC	316	12,4	11,8	-7,03	13,88
3-CH_3-BC	337	12,2	11,6	-7.58	13.84
Normale Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13					
BC	100	11,77	11,17	-11,46	14,55
4-Cl-BC	11,3	4,3	3,7	-41,11	15,83
Pyrocatechase aus A. eutrophus B.9					
BC	100	11,8	11,2	-11,36	14,55
4-Cl-BC	7,0	5,3	4,7	-38,68	16,11

Die Werte für $\Delta S^{\ddagger}$ und $T\Delta S^{\ddagger}$ wurden für die Temperatur T=295 K berechnet. Bestimmungsgleichungen siehe Text.
e.u. = Entropieeinheit = cal mol^{-1} $grad^{-1}$

Nach einer groben Charakterisierung entspricht $\Delta H^{\ddagger}$ der Energie die für die Lösung von Bindungen zur Ausbildung des Übergangszustandes erforderlich ist (SYKES, 1972, S. 40 ff). Die Aktivierungsentropie beschreibt die Wahrscheinlichkeit der Bildung des Übergangszustandes. Ein großer negativer Wert für $\Delta S^{\ddagger}$ ist ein Charakteristikum einer sehr "unwahrscheinlichen" Reaktion (EGGERT, 1968, S. 791 ff). In der Arrhenius-Gleichung (Gl. 7)

bedeutet das einen kleinen Wert für k_o, den "sterischen Faktor".

Aus der vergleichenden Biochemie ist bekannt, daß isofunktionelle Enzyme aus verschiedenen Organismen sich kaum im Aufbau der Substratbindungsstelle unterscheiden (FONDY et al., 1965; HARRIS, 1964; HARRIS und PERHAM, 1969). Nach KOSHLAND und NEET (1968) differieren solche Enzyme auch nicht im Reaktionsmechanismus. Die unterschiedliche Fähigkeit zur Erniedrigung der freien Aktivierungsenthalpie $\Delta G^{\ddagger}$ liegt vielmehr in kleinen Veränderungen der Proteinstruktur, die sich auf die Geometrie im aktiven Zentrum auswirken (LOW et al., 1973).

3. Biochemische Adaptation an neue Substrate und Umweltbedingungen

Ein wesentliches Problem beim Abbau chloraromatischer Verbindungen besteht in der durch den Substituenten Chlor bewirkten Verlangsamung wichtiger Reaktionen. Am Modell der Pyrocatechasereaktion, die gleichzeitig eine zentrale Rolle beim Abbau aromatischer Verbindungen einnimmt, konnten folgende Gesetzmäßigkeiten erkannt werden:

1. Die größere Raumerfüllung des Substituenten Chlor, verglichen mit Wasserstoff, kann nicht als generelles Persistenzprinzip angesehen werden. Wie am Beispiel der Chlorpyrocatechase gezeigt wurde, ist die Bildung von Enzymen mit verminderter Spezifität und erhöhter Affinität zu substituierten Substraten möglich.
2. Der negativ induktive Effekt des Substituenten Chlor verlangsamt die Geschwindigkeit der Brenzcatechinoxygenierung und stellt damit eine allgemein gültige Persistenzursache dar. Mit zunehmendem Chlorierungsgrad nimmt die Basizität des aromatischen Kerns und damit die Reaktivität für eine elektrophile Reaktion ab.
3. Der positiv mesomere Effekt des Substituenten Chlor kann in ortho- und para-Stellung zum neueingetretenen Sauerstoff die elektronenabziehende Wirkung etwas vermindern, aber nicht aufheben.
4. Die Erhöhung der freien Aktivierungsenthalpie $\Delta G^{\ddagger}$ durch den Substituenten Chlor kann durch die Bildung eines effektiveren Biokatalysators, das heißt durch Chlorpyrocatechase, teilweise kompensiert werden.

Die Anpassung von Organismen an niedrige Temperaturen bis unter den Gefrierpunkt des Wassers weist einige Parallelen zur oben diskutierten Problematik auf. Niedere Temperaturen verlangsamen ebenfalls die Stoffwechselreaktionen. Zum Beispiel konnten bei der Adaptation der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri) von 18 an 4 ^{o}C von SOMERO und HOCHACHKA (1971) folgende biochemische Veränderungen beobachtet werden. Die Aktivität von Stoffwechselwegen (Hexosemonophosphatweg) nahm zu. Es wurden für alle unter-

suchten Enzymfunktionen (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Pyruvat-Kinase, Isocitrat-Dehydrogenase, Phosphofructokinase) Isoenzyme nachgewiesen. Deren K_m-Werte waren bei 4 °C am niedrigsten, während die bei 18 °C induzierten Enzyme auch bei dieser Testtemperatur die niedrigsten K_m-Werte aufwiesen (SOMERO und HOCHACHKA, 1968; FREEDMAN, 1975). BALDWIN und HOCHACHKA (1970) sowie SOMERO (1969) wiesen bei einer mittleren Wassertemperatur beide Isoenzyme der Acetylcholinesterase im Gehirn der Regenbogenforelle nach. Für die Lactat-Dehydrogenese, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Glykogenphosphorylase b aus Kaltblütern wie Hummer, Heilbutt und Dorsch konnten höhere Wechselzahlen und kleinere Werte für die freie Aktivierungsenthalpie ($\Delta G^{\ddagger}$) nachgewiesen werden als für die analogen Enzyme aus Warmblütern wie Kaninchen und Hühnern (LOW, 1973). Kleinere K_m-Werte haben zur Folge, daß bei gleicher Substratkonzentration unterhalb der Substratsättigung höhere Umsatzgeschwindigkeiten erreicht werden.

Beim Transfer von Pseudomonas Stamm B.13 von Benzoat auf m-Chlorbenzoat als Wachstumssubstrat wurden folgende Veränderungen beobachtet:

1. Die Abbauenzyme Benzoatoxygenase (2-fach), DHB-Dehydrogenase (2-fach) (REINEKE, 1976) und die normale Pyrocatechase (3 - 4-fach) wurden in höherer Konzentration gebildet.
2. Das isofunktionelle Enzym Chlorpyrocatechase wird induziert und besitzt folgende Eigenschaften:
   a) Die K_m-Werte für 3- und 4-Chlorbrenzcatechin sind sehr klein.
   b) Die Umsatzgeschwindigkeiten bei und unterhalb der Substratsättigung sind verglichen mit Brenzcatechin stark erhöht.
   c) Die Aktivierungsenthalpie $\Delta H^{\ddagger}$ wird stärker erniedrigt.

Die biochemische Adaptation an die Verwertung schwerabbaubarer Verbindungen und an niedere Temperaturen weist demnach deutliche Analogien auf.

Die Evolution von Enzymen mit veränderten Substratspezifitäten (CLARKE, 1974; BETZ et al., 1974; RIGBY et al., 1974) und Regulationsmechanismen (JENSEN und PIERSON, 1975; SMYTH und CLARKE, 1975a,b) zur Verwertung neuer Substrate ist möglich. Somit müssen vor allem die elektronischen und weniger die sterischen Einflüsse des Substituenten Chlor für die Persistenz chloraromatischer Verbindungen verantwortlich gemacht werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Pseudomonas Stamm B.13 verwertet m-Chlorbenzoat über 3- und 4-Chlorbrenzcatechin mit nachfolgender ortho-Spaltung. Neben einer bei Anzucht auf Benzoat allein induzierten gewöhnlichen Pyrocatechase bildet der Organismus beim Wachstum auf m-Chlorbenzoat ein zweites "isofunktionelles" Enzym ("Chlorpyrocatechase"), welches auch Monochlorbrenzcatechine schnell umsetzt.

2. Durch DEAE-Zellulosechromatographie des Rohextraktes aus Zellen nach Anzucht auf m-Chlorbenzoat konnten Chlorpyrocatechase und normale Pyrocatechase deutlich voneinander getrennt werden. Die spezifische Aktivität der Chlorpyrocatechase konnte wegen ihrer Instabilität gegen Verdünnen, Dialyse, DEAE-Zellulose- und DEAE-Sephadex-Chromatographie nicht gesteigert werden. Dagegen war es möglich, die normale Pyrocatechase durch Chromatographie an DEAE-Zellulose, DEAE-Sephadex und mit Hilfe der Sephadex G 200-Gelfiltration 29-fach anzureichern. Es wurde eine spezifische Aktivität von 20 E/mg Protein erreicht. Die kinetischen Eigenschaften der beiden Enzyme änderten sich während der Reinigungsschritte nicht. Das Spektrum der normalen Pyrocatechase zeigte zwischen 400 und 500 nm eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum bei 440 nm.

3. Die zwei Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 zeigten unterschiedliche R_f-Werte bei der kontinuierlichen Gelelektrophorese. Mit Hilfe der Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation wurde für die Chlorpyrocatechase (52 000 Dalton) ein kleineres Molekulargewicht bestimmt als für die normale Pyrocatechase (66 000 Dalton). Unterschiedliche Ergebnisse bei Anwendung anderer Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung deuten auf eine fibrilläre Molekülform der normalen Pyrocatechase hin. Die Chlorpyrocatechase war im Gegensatz zur normalen Pyrocatechase kältelabil. Beide Enzyme besaßen bei pH 8,0 ihr Aktivitätsoptimum. Die Chlorpyrocatechase wurde unterhalb pH 7,5 schnell irreversibel desaktiviert. Dagegen lag diese Grenze für die normale Pyro-

catechase erst bei pH 6,0. Die zwei Enzyme aus Ps. Stamm B.13 wurden durch "SH-Gifte" (Hg^{2+}, Cu^{2+}, p-CMB) verschieden stark gehemmt. Mit 3-Methylbrenzcatechin als Substrat zeigte die normale Pyrocatechase sowohl ortho- als auch meta-Spaltung im Verhältnis 14 : 1.

4. Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten und die K_m- bzw. K_i-Werte wurden für verschieden substituierte Fluor-, Chlor-, Brom- und Methylbrenzcatechine mit den zwei Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 und der Pyrocatechase aus Alcaligenes eutrophus B.9 bestimmt. An Hand der kinetischen Daten wurden die Substituenteneinflüsse auf die Bindung und den Umsatz der Substrate diskutiert.

5. Die gewöhnlichen Pyrocatechasen für die Verwertung von Benzoat in Ps. Stamm B.13 und A. eutrophus besaßen jeweils die gleichen relativen Umsatzraten mit substituierten Brenzcatechinen. Auch die relativen K_m- bzw. K_i-Werte stimmten bei beiden Enzymen gut überein. Diese zwei Pyrocatechasen zeigten einerseits für 3-substituierte Brenzcatechine hohe Affinitäten und niedrige Umsatzraten, andererseits wurden für die in 4-Stellung substituierten Derivate niedrige Affinitäten und relativ hohe Umsatzgeschwindigkeiten gemessen. Dagegen wurden 3- und 4-substituierte Brenzcatechine von der Chlorpyrocatechase gleich gut gebunden und etwa gleich schnell oxygeniert. Die Chlorpyrocatechase zeigte durchweg höhere Aktivitäten für substituierte Brenzcatechine, bezogen auf den Umsatz von Brenzcatechin, als die gewöhnlichen Pyrocatechasen.

6. Die K_m- bzw. K_i-Werte der gewöhnlichen Pyrocatechasen aus Ps. Stamm B.13 und A. eutrophus B.9 für substituierte Brenzcatechine erfüllten die HAMMETT-Gleichung sehr viel schlechter als die entsprechenden Werte der Chlorpyrocatechase. Die gewöhnlichen Pyrocatechasen besitzen demnach eine höhere Stereospezifität als die Chlorpyrocatechase. Bei allen untersuchten Enzymen erhöhte sich die Affinität für die in gleicher Stellung substituierten Brenzcatechine unter dem Einfluß von elektronenabziehenden Substituenten wie Halogen.

7. Auch die maximalen Umsatzraten der Chlorpyrocatechase korrelierten bei der HAMMETT-Auftragung besser mit einer Geradengleichung als die Daten der normalen Pyrocatechase aus Ps. Stamm B.13. Elektronenabstoßende Substituenten wie Methyl erhöhten und Elektronenacceptoren wie Halogen erniedrigten die Geschwindigkeit der Ringspaltungsreaktion von substituierten Brenzcatechinen. Die niedrigen K_m-Werte der Chlorpyrocatechase für 3- und 4-Chlorbrenzcatechin und die geringe Stereospezifität des Enzyms wurden als wichtige Vorraussetzungen für den raschen Umsatz der chlorierten Substrate erkannt.

8. Die Chlorpyrocatechase erniedrigte die Arrhenius-Aktivierungsenergien der Ringspaltungsreaktionen von Brenzcatechin und dem 4-Chlorderivat stärker als die gewöhnlichen Pyrocatechasen. Die Aktivierungsenthalpien der Reaktionen mit chlorierten Brenzcatechinen waren niedriger als die entsprechenden Werte der Methylbrenzcatechine. Dagegen waren die relativen Werte der Aktivierungsentropie für die Ringöffnung von Chlorbrenzcatechinen sehr viel höher als die der methylsubstituierten Substrate.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

ACKERS, G.K. 1964 Molecular exclusion and restricted diffusion processes in molecular-sieve chromatography. Biochemistry 3, 723 - 730 .

ALEXANDER, M. 1973 Biotechnology report. Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules. Biotechnol. Bioengin. 15, 611 – 647

ALEXANDER, M. 1975 Environmental and microbiological problems arising from recalcitrant molecules. Microbial Ecology 2, 17 - 27

ANDREWS, P. 1964 Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. Biochem. J. 91, 222 - 233

ARRHENIUS, S. 1889 Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Z. Physik. Chem. 4, 226 - 248

BALDWIN, J
HOCHACHKA, P.W. 1970 Functional significance of isoenzymes in thermal acclimation: acetylcholinesterase from trout brain. Biochem. J. 116, 883 - 887

BEISENHERZ, G.
BOLTZE, H.J.
BÜCHER, T.
CZOK, R.
GARBADE, K.H.
MEYER-ARENDT, E.
PFLEIDERER, G. 1953 Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturf. 8B, 555 - 577

BERGMANN, J.G.
SANIK, J. Jr. 1957 Determination of trace amounts of chlorine in naphtha. Analyt. Chem. 29, 241 - 243

BERGMEYER, H.U. 1955 Zur Messung von Katalase-Aktivitäten. Biochem. Z. 327, 255 - 258

BETZ, J.L.
BROWN, P.R.
SMYTH, M.J.
CLARKE, P.J. 1974 Evolution in action. Nature 247, 261 - 264

BEYER, H. 1966 Lehrbuch der organischen Chemie. S. Hirzel Verlag, Leibzig

BOLLAG, J.-M. 1974 Microbial transformation of pesticides. Adv. Appl. Microbiol. 18, 75 - 130

BROWN, H.C.
OKAMOTO, Y. 1957 Substituent constants for aromatic substitution. J. Am. Chem. Soc. 79, 1913 - 1920

BROWN, H.C.
OKAMOTO, Y. 1958 Electrophilic substituent constants. J. Am. Chem. Soc. 80, 4979 - 4987

CANN, J.R.
GOAD, W.B. 1968 In: Advances in Enzymology (F.F. NORD, editor), Vol. 30, 139, Interscience, New York.

CASTRO, C.E.
BARTNICKI, E.W. 1968 Biodehalogenation. Epoxidation of halohydrins, epoxide opening and transhalogenation by a Flavobacterium sp. Biochemistry 7, 3213 - 3218

CLARKE, P.H. 1974 The evolution of enzymes for the utilisation of novel substrates. In "Evolution in the microbial world", Carlile, M.J. und Skehel, I.J. (Eds.) Soc. General Microbiol. Symp. 24 , 183 - 217

DAVIES, J.I.
EVANS, W.C. 1962 The elimination of halide ions from aliphatic halogen-substituted organic acids by an enzyme preparation from Pseudomonas dehalogenans. Bichem. J. 82, 50p - 51p

DOONAN, S. 1973 The biochemistry of carbon-halogen compounds.
In: The chemistry of the carbon-halogen bond, Part 2, pp. 865 - 915 (S. Patai, ed.)
John Wiley & Sons, London

DORN, E. 1973 Der Einfluß der Chlorsubstitution auf die Oxygenierung von Brenzcatechin durch Bakterien.
Diplomarbeit, Göttingen

DORN, E.
HELLWIG, M.
REINEKE, W.
KNACKMUSS, H.-J. 1974 Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading Pseudomonad.
Arch. Microbiol. 99, 61 - 70

DUXBURY, J.M.
TIEDJE, J.M.
ALEXANDER, M.
DAWSON, J.E. 1970 2,4-D metabolism: enzymatic conversion of chloromaleylacetic acid to succinic acid.
J. Agr. Food. Chem. 18, 199 - 201

EGGERT, J. 1968 Lehrbuch der Physikalischen Chemie
S. Hirzel Verlag, Stuttgart

ELVIDGE, J.A.
LINSTEAD, R.P.
SIMS, P.
ORKIN, B.A. 1950 The third isomeric (cis,trans)-muconic acid.
J. Chem. Soc. 2235 - 2241

ERNEST, J 1972 Bindung, Struktur und Reaktionsmechanismen in der Organischen Chemie.
Springer-Verl., Wien, New York S. 237

EVANS, W.C.
SMITH, B.S.W.
FERNLEY, H.N.
DAVIES, J.I. 1971a Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate.
Biochem. J. 122, 543 - 551

EVANS, W.C.
SMITH, B.S.W.
MOSS, P.
FERNLEY, H.N. 1971b Bacterial metabolism of 4-chlorophenoxyacetate.
Biochem. J. 122, 509 - 517

FEWSON, C.A.
KENNEDY, S.I.T.
LIVINGSTONE, A.
1968 Metabolism of monofluorobenzoates by Bacterium N.C.I.B.8250.
Biochem. J. 109, 6 - 7

FONDY, T.P.
EVERSE, J.
DRISCOLL, G.A.
CASTILLO, F.
STOLZENBACH, F.E.
KAPLAN, N.O.
1965 The comperative enzymology of lactic dehydrogenases.
IV. Function of sulfhydryl groups in lactic dehydrogenases and the sequence around the essential group.
J. Biol. Chem. 240, 4219 - 4234

FREEDMAN, R.
1975 Biochemical adaptation to the environment
New Scient. 67. 270 -271

FUJISAWA, H.
UYEDA, M.
KOJIMA, Y.
NOZAKI, M.
HAYAISHI, O.
1972a Protocatechuate 3,4-dioxygenase
II. Electron spin resonance and spectral studies on interaction of substrates and enzyme.
J. Biol. Chem. 247, 4414 - 4421

FUJISAWA, H.
HIROMI, K.
UYEDA, M.
OKUNO, S.
NOZAKI, M.
HAYAISHI, O.
1972b Protocatechuate 3,4-dioxygenase
III. An oxygenated form of enzyme as reaction intermediate.
J. Biol. Chem. 247, 4422 - 4428

FUJIWARA, M.
GOLOVLEVA, L.A.
SAEKI, Y.
NOZAKI, M.
HAYAISHI, O.
1975 Extradiol cleavage of 3-substituted catechols by an intradiol dioxygenase, pyrocatechase, from a Pseudomonad.
J. Biol. Chem. 250, 4848 - 4855

GAUNT, J.K.
EVANS, W.C.
1971 Metabolism of 4-chloro-2-methyl-phenoxyacetate by a soil Pseudomonad. Ring-fission, lactonizing and delactonizing enzymes.
Biochem. J. 122, 533 - 542

GELOTTE, E.
1960 Studies on gel filtration. Sorption properties of the bed material Sephadex.
J. Chromatog. 3, 330 - 342

GIBSON, D.T. 1968 Microbial degradation of aromatic compounds.
Science 161, 1093 - 1097

GOLDMAN, P. 1965 The enzymatic cleavage of the carbon-fluorine bond in fluoroacetate.
J. Biol. Chem. 240, 3434 - 3438

GOLDMAN, P.
MILNE, G.W.A.
PIGNATARO, M.T. 1967 Fluorine-containing metabolites formed from 2-fluorobenzoic acid by Pseudomonas sp.
Arch. Biochem. 118, 178 - 184

HAMILTON, G.A. 1974 Chemical models and mechanisms for oxygenases.
In: Molecular mechanisms of oxygen activation, Hayaishi, O. (ed.), Acad. Press, New York, London. 405 - 451

HAMMETT, L.P. 1937 The effect of structure upon the reactions of organic compounds. Benzene derivatives.
J. Am. Chem. Soc. 59, 96 - 103

HAN, M.H. 1972 Non-linear Arrhenius plots in temperature dependent kinetic studies of enzyme reaction.
I. Single transition processes.
J. Theor. Biol. 35, 543 - 568

HARPER, D.B.
BLAKLEY, E.R. 1971 The metabolism of p-fluorobenzoic acid by Pseudomonas sp.
Can. J. Microbiol. 17, 1015 - 1023

HARRIS, J. 1964 Structure and catalytic activity of alcohol dehydrogenases.
Nature 203, 30 - 34

HARRIS, J.I.
PERHAM, R.N. 1969 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from pig muscle.
Nature 219, 1025 - 1028

HAYAISHI, O. 1969 Electronic aspects of catalysis of the oxygenases
Ann. N.Y. Acad. Sci. 158, 318 - 335

HAYAISHI, O. 1950 Pyrocatechase
A new enzyme catalyzing oxidative breakdown of pyrocatechin.
J. Biochem. 37, 371 - 374

HAYAISHI, O.
KATAGIRI,M.
ROTHBERG, S. 1955 Mechanism of the pyrocatechase reaction.
J. Am. Chem. Soc. 77, 5450 - 5451

HAYAISHI, O.
KATAGIRI, M.
ROTHBERG, S. 1957 Studies on oxygenases.
Pyrocatechase.
J. Biol. Chem. 229, 905 - 920

HENSCHLER, D. 1973 Veränderung der Umwelt - Toxicologische Probleme.
Angew. Chem. 85, 317 - 326

HESS, B. 1973 Organization of glycolysis: oscillatory and stationary control.
Symp. Soc. Exp. Biol. XXVII, 105 - 131

HESS, B.
BOITEUX, A.
KRÜGER, J. 1969 Cooperation of glycolytic enzymes.
Adv. Enz. Regul. 7, 149 - 167

HORVATH, R.S. 1971 Cometabolism of the herbicide 2,3,6-trichlorobenzoate.
J. Agr. Food Chem. 19, 283 - 291

HORVATH, R.S. 1972 Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature.
Bact. Rev. 36, 146 - 155

HORVATH, R.S.
ALEXANDER, M. 1970 Cometabolism of m-chlorobenzoate by an Arthrobacter.
Appl. Microbiol. 20, 254 - 258

ICHIHARA, A.
ADACHI, K.
HOSOKAWA, K.
TAKEDA, Y. 1962 The enzymatic hydroxylation of aromatic carboxylic acids; substrate specifities of anthranilate and benzoate oxidases.
J. Biol. Chem. 237, 2296 - 2302

ITOKAWA, Y.
KOMOHARA, K.
FUJIWARA, K.
1973 Toxicity of PCB's increased with simultaneous ingestion of alkylbenzene sulfonic acid salt.
Experientia 29, 822 - 823

JAFFE, H.H.
1953 A reexamination of the HAMMETT equation.
Chem. Revs. 53, 191 - 261

JENSEN, R.A.
PIERSON, D.L.
1975 Evolutionary implications of different types of microbial enzymology for L-tyrosine biosynthesis.
Nature 254, 667 - 671

JOHNSON, B.F.
STANIER, R.Y.
1971a Dissimilation of aromatic compounds by Alcaligenes eutrophus.
J. Bacteriol. 107, 468 - 475

JOHNSON, B.F.
STANIER, R.Y.
1971b Regulation of the β-ketoadipate pathway in Alcaligenes eutrophus.
J. Bacteriol. 107, 476 - 485

KAUFMAN, S.
1971 The phenylalanine hydroxylating system from mammalian liver.
Adv. Enzymol. 35, 245 - 320

KEARNEY, P.C.
KAUFMAN, D.D.
BEALL, M.L.
1963 Enzymatic dehalogenation of 2,2-dichloropropionate.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 14, 29 - 33

KITA, H.
MIYAKE, Y.
ONO, M. (KAMIMOTO)
1969 Studies on oxygenases
I. Comparative studies on 3,4-dihydroxy-phenylacetate-2,3-oxygenase and pyrocatechase by electron spin resonance spectroscopy.
J. Biochem. 66, 45 - 50

KNOX, W.E.
EDWARDS, S.E.
1955 The properties of maleylacetoacetate, the initial product of homogentisate oxidation in liver.
J. Biol. Chem. 216, 489 - 498

KO, W.H.
LOCKWOOD, J.L.
1968 Accumulation and concentration of chlorinated hydrocarbon pesticides by microorganisms in soil.
Can. J. Microbiol. 14, 1075 - 1078

KOJIMA, Y.
FUJISAWA, H.
NAKAZAWA, A.
KANETSUNA, F.
TANIUCHI, H.
NOZAKI, M.
HAYAISHI, O.
1967 Studies on pyrocatechase
I. Purification and spectral properties.
J. Biol. Chem. 242, 3270 - 3278

KOSHLAND, D.E. Jr.
NEET, K.E.
1968 The catalytic and regulatory properties of enzymes.
Ann. Rev. Biochem. 37, 359 - 410

KUMAMOTO, J.
RAISON, J.K.
LYONS, J.M.
1971 Temperature "breaks" in Arrhenius plots: A thermodynamic consequence of a phase change.
J. Theor. Biol. 31, 47 - 51

LAURENT, T.C.
KILLANDER, J.
1964 A theory of gel filtration and its experimental verification.
J. Chromatog. 14, 317 - 330

LEHRER, G.M.
BARKER, R.
1970 Conformational changes in rabbit muscle aldolase.
Biochemistry 9, 1533 - 1539

LINEVEAVER, H.
BURK, D.
1934 The determination of enzyme dissociation constants.
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 - 666

LIPKE, H.
KEARNS, C.W.
1959 DDT dehydrochlorinase.
I. Isolation, chemical properties, and spectrophotometric assay.
J. Biol. Chem. 234, 2123 - 2128

LOOS, M.A.
ROBERTS, M.N.
ALEXANDER, M.
1967 Phenols as intermediates in the decomposition of phenoxyacetates by an Arthrobacter sp.
Can. J. Microbiol. 13, 679 - 690

LOW, P.S.
BADA, J.L.
SOMERO, G.N.
1973 Temperature adaptation of enzymes: role of the free energy, the enthalpy and the entropy of activation.
Proc. Nat. Acad. Sci. US. 70, 430 - 432

MARGOLIS, J.
KENRICK, K.G. 1968 Polyacrylamide gel electrophoresis in a continuous molecular sieve gradient. Anal. Biochem. 25, 347 - 362

MARTIN, R.G.
AMES, B.N. 1961 A method for determining the sedimentation behavior of enzymes. Application to protein mixtures. J. Biol. Chem. 236, 1372 - 1379

MASON, H.S. 1957 Mechanisms of oxygen metabolism. Adv. Enzymol. 19, 79 - 233

MAURER, H.R. 1968 Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese. Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin

McDANIEL, D.H.
BROWN, H.C. 1968 An extended table of HAMMETT substituent constants based on the ionization of substituted benzoic acids. J. Org. Chem. 23, 420 - 427

MILNE, G.W.A.
GOLDMAN, P.
HOLTZMAN, J.L. 1968 The metabolism of 2-fluorobenzoic acid. II. Studies with $^{18}O_2$ J. Biol. Chem. 243, 5374 - 5376

MURRAY, K.
DUGGLEBY, C.J.
SALA-TREPAT, J.M.
WILLIAMS, P.A. 1972 The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the meta-cleavage pathway by Pseudomonas arvilla mt-2. Eur. J. Biochem. 28, 301 - 310

NAGAMI, K.
SENOH, S. 1974 Studies on the active site of Brevibacterium pyrocatechase. J. Biochem. 75, 389 - 398

NAKAGAWA, H.
INOUE, H.
TAKEDA, Y. 1963 Characteristics of catechol oxygenase from Brevibacterium fuscum. J. Biochem. 54, 65 - 74

NAKAZAWA, T.
KOJIMA, Y.
FUJISAWA, H.
NOZAKI, M. 1965 Studies on the mechanism of action of pyrocatechase by electron spin resonance spectroscopy. J. Biol. Chem. 240, PC3224 - PC3226

NAKAZAWA, T.
NOZAKI, M.
HAYAISHI, O. 1969 Studies on pyrocatechase
II. Electron spin resonance and other properties of iron in the active center.
J. Biol. Chem. 244, 119 - 125

NOZAKI, M. 1974 Nonheme iron dioxygenase.
In: Molecular mechanisms of oxygen activation, Hayaishi, O. (ed.), Acad. Press, New York, London

NOZAKI, M.
ONO, K.
NAKAZAWA, T.
KOTANI, S.
HAYAISHI, O. 1968 Metapyrocatechase.
II. The role of iron and sulfhydryl groups.
J. Biol. Chem. 243, 2682 - 2690

NOZAKI, M.
SHIGEKO, K.
KATSUHIKO, O.
SENOH, S. 1970 III. Metapyrocatechase:
Substrate specifity and mode of ring fission.
Biochim. Biophys. Acta 220, 213 - 223

OEDING, V. 1972 Regulation des Poly-β-hydroxybuttersäure-Stoffwechsels in Hydrogenomonas eutropha Stamm H 16 und PHBS-freie Mutanten.
Diss. Göttingen

ORGANIKUM 1970 Organisch-Chemisches Grundpraktikum.
9. Aufl., VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin

ORNSTON, L.N. 1966a The conversion of catechol and protocatechuate to β-ketoadipate by Pseudomonas putida.
II. Enzymes of the protocatechuate pathway.
J. Biol. Chem. 241, 3787 - 3794

ORNSTON, L.N. 1966b The conversion of catechol and protocatechuate to β-ketoadipate by Pseudomonas putida.
III. Enzymes of the catechol pathway.
J. Biol. Chem. 241, 3795 - 3799

ORNSTON, L.N. 1971 Regulation of catabolic pathways in Pseudomonas.
Bact. Rev. 35, 87 - 116

ORNSTON, L.N.
STANIER, R.Y.
1966 The conversion of catechol and protocatechuate to β-ketoadipate by Pseudomonas putida.
I. Biochemistry.
J. Biol. Chem. 241, 3776 - 3786

PEACOCKE, A.R.
SCHACHMAN, H.K.
1954 Studies on the sedimentation behavior of the thymus deoxypentose nucleic acid with reference to its homogenity, size, and shape.
Biochim. Biophys. Acta 15, 198 - 210

PETTY, M.A.
1961 An introduction to the origin and biochemistry of microbial halometabolites.
Bact. Rev. 25, 111 - 130

PFENNIG, N.
LIPPERT, K.D.
1966 Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.
Arch. Microbiol. 55, 245 - 256

PORATH, J.
1963 Some recently develloped fractionation procedures and their application to peptide and protein hormones.
Pure Appl. Chem. 6, 233 - 244

RACKER, E.
1947 Spectrophotometric measurements of hexokinase and phosphohexokinase activity.
J. Biol. Chem. 167, 843 - 854

REINEKE, W.
1976 Ursachen des verlangsamten biologischen Abbaus von halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen: Modelluntersuchungen an substituierten Benzoaten und 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren.
Diss. Göttingen

REINER, A.M.
1972 Metabolism of aromatic compounds in bacteria. Purification and properties of the catechol-forming enzyme, 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid (NAD^+) oxidoreductase.
J. Biol. Chem. 247, 4960 - 4965

RESSLER, N. 1973 A systematic procedure of the determination for the heterogenity and nature of multiple electrophoretic bands. Anal. Biochem. 51, 589 - 610

RESSLER, N.
LEE, S. 1970 Tissue characteristic forms of glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase. Biochem. J. 119, 85 - 88

RIBBONS, D.W. 1965 The microbiological degradation of aromatic compounds. Ann. Rep. Progr. Chem. 62, 445 - 468

RIGBY, P.W.J.
BURLEIGH, B.D. Jr.
HARTLEY, B.S. 1974 Gene duplication in experimental enzyme evolution. Nature 251, 200 - 204

ROLLESTON, F.S. 1972 A theoretical background to the use of measured concentrations of intermediates in study of the control of intermediary metabolism. Curr. Top. Cell. Regul. 5, 47 - 75

RÖMPP, H. 1962 Chemie Lexikon Franckh`sche Verlagshandlung Stuttgart

SCHACHMAN, H.K. 1959 Ultracentrifugation in biochemistry. Acad. Press, Inc. New York

SEIDMAN, M.M.
TOMS, A.
WOOD, J.M. 1969 Influence of side-chain substituents on the position of cleavage of the benzene ring by Pseudomonas fluorescens. J. Bacteriol. 97, 1192 - 1197

SHARPEE, K.W.
DUXBURY, J.M.
ALEXANDER, M. 1973 2,4-Dichlorophenoxyacetate metabolism by Arthrobacter sp.: accumulation of a chlorobutenolid. Appl. Microbiol. 26, 445 - 447

SIEGEL, L.M.
MONTY, K.J. 1966 Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Applications to crude preparations of sulfite and hydroxyl-amine reductase. Biochim. Biophys. Acta 112, 346 - 362

SMYTH, P.F.
CLARKE, P.H. 1975a Catabolite repression of Pseudomonas aeruginosa amidase: the effect of carbon source on amidase synthesis.
J. Gen. Microbiol. 90, 81 - 90

SMYTH, P.F.
CLARKE, P.H. 1975b Catabolite repression of Pseudomonas aeruginosa amidase: isolation of promotor mutants.
J. Gen. Microbiol. 90, 91 - 99

SOMERO, G.N. 1969 Pyruvate kinase variants of the Alaska king crab: Evidence for a temperature dependent interconversion between two forms having distinct- and adaptive kinetic properties.
Biochem. J. 114, 237 - 241

SOMERO, G.N.
HOCHACHKA, P.W. 1968 The effect of temperature on the catalytic and regulatory properties of pyruvat kinases of the rainbow trout and the antarctic fish Trematomus bernacchii.
Biochem. J. 110, 395 - 400

SOMERO, G.N.
HOCHACHKA, P.W. 1971 Biochemical adaptation to the environment.
Am. Zoologist 11, 159 - 167

SQUIRE, P.G. 1964 A relationship between the molecular weights of macromolecules and their elution volumes based on a model of Sephadex gel filtration.
Arch. Biochem. Biophys. 107, 471 - 478

STANIER, R.Y.
INGRAHAM, J.L. 1954 Protocatechuic acid oxidase.
J. Biol. Chem. 210, 799 - 808

STANIER, R.Y.
ORNSTON, L.N. 1973 The β-ketoadipate pathway.
Adv. Microbiol. Phys. 9, 89 - 151

SYKES, P. 1972 Reaktionsmechanismen der organischen Chemie. Eine Einführung.
5. Aufl. , Verlag Chemie, Weinheim, Bergstraße

TALSKY, G. 1971 Zur anomalen Temperaturabhängigkeit enzymkatalysierter Reaktionen.
Angew. Chem. 83, 553 - 594

TANIUCHI, H.
KOJIMA, Y.
NAKAZAWA, A.
HAYAISHI, O.
1964 Properties of pyrocatechase.
Fed. Proc. 23, 429

TIMBERLAKE, C.F.
1957 A potentiometric and polarographic study of copper-catechol complexes.
J. Chem. Soc. 4987 - 4993

TRANTER, E.K.
CAIN, R.B.
1967 The degradation of fluoroaromatic compounds to fluorocitrate and fluoroacetate by bacteria.
Biochem. J. 103, 22p - 23p

TRECCANI, V.
GALLI, E.
CATELANI, D.
SORLINA, C.
1968 Induction of 1,2- and 2,3-diphenol oxygenases in Pseudomonas desmolyticum.
Z. Allg. Mikrobiol. 8, 65 - 69

TYSON, Ch. A.
1975 4-Nitrocatechol as a colorimetric probe for nonheme iron dioxygenase.
J. Biol. Chem. 250, 1765 - 1770

VARGA, J.M.
NEUJAHR, H.Y.
1970 Purification and properties of catechol 1,2-oxygenase from Trichosporon cutaneum.
Eur. J. Biochem. 12, 427 - 434

VESTERBERG, O.
1972 Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels.
Biochim. Biophys. Acta. 257, 11 - 19

WALKER, N.
HARRIS, D.
1970 Metabolism of 3-chlorobenzoic acid by Azotobacter species.
Soil Biol. Biochem. 2, 27 - 32

WARBURG, O.
CHRISTIAN, W.
1941 Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase.
Biochem. Z. 310, 384 - 421

WELLS, P.R.
1963 Linear free energy relationships.
Chem. Revs. 63, 171 - 219

WESTHEIMER, F.H.
1962 Mechanisms related to enzyme catalysis.
Adv. Enzymol. 24, 441 - 482

YPHANTIS, D.A. 1964 Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. Biochemistry 3, 297 - 317

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H.-J. Knackmuss für die Überlassung des Themas, für sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die mir stets gewährte Unterstützung danken.

Ich danke Frau Dr. Ellen-M. Gottschalk für die exakte Durchführung der Experimente mit der analytischen Ultrazentrifuge.

Herrn Dr. G. Wolf danke ich für die Bereitstellung der Gradientengele und für die Anleitung zur Durchführung der Porengrößengradienten-Gelelektrophorese.

Der Gesellschaft für Srahlen- und Umweltforschung mbH München sei für die Gewährung eines Doktorandenstipendiums gedankt.

LEBENSLAUF

Am 8. März 1949 wurde ich, Erich Dorn, als Sohn des Landwirts Heinrich Dorn und seiner Ehefrau Emmy, geb. Schmidt, in Hofen geboren. Von 1955 bis 1960 besuchte ich die Grundschule in Hofen und wechselte dann zum Gymnasium in Limburg/Lahn (Tilemannschule) über, wo ich am mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig im Sommer 1968 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1968/69 begann ich an der Justus-Liebig-Universität in Giessen/Lahn mit dem Studium der Biologie, das ich im Sommersemester 1971 an der Georg-August-Universität in Göttingen fortsetzte. Im Oktober 1972 legte ich die Diplom-Hauptprüfung für Biologie in den Fächern Mikrobiologie, Physikalische Chemie und Physiologische Chemie ab. Die anschließend am Institut für Mikrobiologie angefertigte Diplomarbeit hatte das Thema: "Der Einfluß der Chlorsubstitution auf die Oxygenierung von Brenzcatechin durch Bakterien". Seit September 1973 arbeite ich im Institut für Mikrobiologie an der vorliegenden Dissertation.